

Universidad Tecnológica de la Mixteca

División de Estudios de Posgrado

**Evaluación de la actividad antitopoisomerasa de
compuestos puros de *Acalypha cuspidata* Jacq.**

Tesis

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos

Presenta

Bióloga Miriam Rojas Horizonte

Dirigida por

Directora de Tesis
Dra. Beatriz Hernández Carlos
Profesora-Investigadora
UTM

Co-directora de Tesis
Dra. Norma Francenia Santos Sánchez
Profesora-Investigadora
UTM

Huajuapán de León, Oaxaca, México, septiembre 2021

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Principios Bioactivos del edificio de Productos Naturales y Alimentos de la División de Estudios de Posgrado y en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM), bajo la dirección de la Dra. Beatriz Hernández Carlos y codirección de la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez. El proyecto contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) con número de becario: 638969.

Esta tesis de maestría generó las participaciones en los eventos académicos siguientes:

“Estudio químico de la parte aérea de *Acalypha cuspidata* (Jacq.)” Miriam Rojas Orizante, Claudia Villanueva Cañongo, Norma Francenia Santos Sánchez, Raúl Salas Coronado y Beatriz Hernández Carlos. Presentado en la modalidad de cartel, en la 4ª Reunión de RMN Experimental Escuela Internacional de Resonancia Magnética Nuclear, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, del 6 al 8 de septiembre del 2018.

“Metabolitos secundarios de *Acalypha cuspidata* (Jacq.) con potencial biológico.” Miriam Rojas Orizante, Norma F. Santos Sánchez, Raúl Salas Coronado, Patricia Talamás Rohana y Beatriz Hernández Carlos. Presentado en la modalidad de cartel, en la 6ª Reunión de RMN Experimental, en su modalidad virtual, Universidad Tecnológica de la Mixteca, los días 12 y 13 de noviembre del 2020.

DEDICATORIA

A mi familia y amigos del alma.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a **Dios**, por darme la oportunidad de culminar una etapa más en mi vida profesional.

A mi familia... el motor de mi vida.

Padres: **Nicolás Rojas Martínez e Isabel Horizonte Pioquinto**

Hermanos: **Yadi, Yame, Yanco, Abi y Dani.**

Cuñados: **Ranulfo e Isai** y cuñada: **Sandra.**

Eternamente gracias por todo.

A la Dra. **Beatriz Hernández Carlos**. Sin duda una excelente doctora, pero sobre todo excelente persona. Gracias por la confianza que me tuvo para realizar esta investigación. Por su apoyo, consejos y dirección incondicional en el transcurso de esta etapa, tanto profesional como personal.

A la Dra. **Norma Francenia Santos Sánchez**. Por todo su apoyo y conocimiento compartido, por su dedicación a este trabajo y sus palabras tan sabias cuando algo estaba mal.

A los revisores de este proyecto, por su aportación significativa y tiempo dedicado
Doctoras: **Mayra Herrera Martínez, Claudia Villanueva Cañongo, Paula Cecilia Guadarrama Mendoza y Thalía I. Ramírez Reyes.**

A mi amigo del alma: **Héctor Cruz Santiago**. Una persona extraordinaria y muy especial en mi vida. Gracias por todo, absolutamente todo.

Y por último, gracias a la especie *Acalypha cuspidata*, fue todo un reto trabajar con ella. Aún restan muchos metabolitos secundarios por descubrir entre sus picudas hojas, fuertes tallos y extravagantes raíces.

RESUMEN

Acalypha cuspidata Jacq. (Euphorbiaceae), conocida comúnmente como hierba de la araña, se usa para tratar enfermedades como la varicela, sarampión y para ayudar a cicatrizar las heridas rápidamente. Los estudios biológicos descritos de fracciones de polaridad intermedia de la parte aérea de *A. cuspidata* han demostrado actividad antimicrobiana, antioxidante, antipoisomerasa, antifúngica, capacidad de inducción de apoptosis en células de cáncer de ovario SKOV-3 y actividad antitumoral en el modelo de ratón Nu/Nu. El objetivo del presente trabajo fue aislar y elucidar las estructuras de los compuestos orgánicos mayoritarios y evaluar la actividad antipoisomerasa de fracciones enriquecidas o compuestos puros de *A. cuspidata*. El estudio químico se realizó en extractos de hojas-flores (**A**), tallos (**B**) y raíces (**C**). La purificación de los compuestos orgánicos se realizó en columnas cromatográficas con C₁₈ y gel de sílice. Del análisis de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se identificaron: metil carboxilato de brevifolina (**I**), mezclas de ácidos grasos insaturados libres, ésteres metílicos de ácidos grasos y triacilglicerol (IIa y IIb), mezcla de ftalatos con ácidos grasos (**III**), derivados del ácido elágico (**IVa**), ácido 3,4-dihidroxibenzoico en mezcla con carbohidratos (**IVb**), 3-*O*-β-D-glucopiranosido del β-sitosterol (**V**), mezcla de carotenos con triacilglicerol (**VI**), estigmasterol (**VII**), mezcla de **VII** y β-sitosterol (**VIII**), 4-*O*-β-D-glucopiranosido del ácido 3,3'-dimetil-elágico (**IX**) y (*E*)-*N*-feruloiltiramina (**X**). La actividad antipoisomerasa se realizó mediante la inhibición/crecimiento de la expansión clonal, utilizando las cepas JN394 y JN362a de *Saccharomyces cerevisiae*. Las mezclas de ácidos grasos libres, ésteres metílicos de ácidos grasos y triacilglicerol (IIa y IIb) mostraron actividad antipoisomerasa inhibiendo el crecimiento de JN394 un 47.7 ± 1.54 y 45.3 ± 2.07 %, respectivamente, y no afectaron el crecimiento de la cepa JN362a (130.34 ± 2.08 y 89.67 ± 1.36 %, respectivamente).

ABSTRACT

Acalypha cuspidata Jacq. (Euphorbiaceae) commonly known as spider grass, is used to treat diseases such as chicken pox, measles, and to help heal wounds quickly. The biological studies described from intermediate polarity fractions of the aerial part of *A. cuspidata* showed antimicrobial, antioxidant, antitopoisomerase, and antifungal activities and apoptosis induction capacity in SKOV-3 ovarian cancer cells, and antitumor activity in the mouse model Nu/Nu. The aim of the investigation was to isolate and elucidate the structures of the main compounds and evaluate the antitopoisomerase activity of enriched fractions or pure compounds. The chemical study carried out examined leaf-flower extracts (**A**), stems (**B**) and roots (**C**). The purification of the organic compounds was performed on C₁₈ and silica gel chromatography columns. Analysis of ¹H and ¹³C NMR spectra led to identify: methyl brevifolincarboxylate (**I**), mixtures of unsaturated fatty acids, fatty acid methyl esters and triacylglycerols (**IIa** y **IIb**), phthalates mixed with fatty acids (**III**), ellagic acid derivatives (**IVa**), 3,4-dihydroxybenzoic acid mixed with carbohydrates (**IVb**), 3-*O*- β -D-glucosyl- β -sitosterol (**V**), carotenes mixed with triacylglycerols (**VI**), stigmasterol (**VII**), stigmasterol mixed with β -sitosterol (**VIII**), 3,3'-dimethylellagic acid-4'-*O*- β -D-glucopyranoside (**IX**) and (*E*)-*N*-feruloyltyramine (**X**). Antitopoisomerase activity was assessed through the inhibition/growth of clonal expansion, using *Saccharomyces cerevisiae* strains JN394 and JN362a. The mixed of unsaturated fatty acids, fatty acid methyl esters and triacylglycerols (**IIa** y **IIb**) showed antitopoisomerase activity by inhibiting the growth of JN394 (47.7 ± 1.54 and 45.3 ± 2.07 % respectively), and did not affect the growth of JN362a (130.34 ± 2.08 and 89.67 ± 1.36 %, respectively).

ÍNDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación.....	2
1.2 Relevancia.....	3
1.3 Hipótesis.....	3
1.4 Objetivos.....	3
1.4.1 Objetivo general.....	3
1.4.2 Objetivos específicos.....	3
1.5 Metas.....	3
1.6 Limitaciones de la tesis.....	4
Capítulo 2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Familia Euphorbiaceae.....	5
2.2 Género <i>Acalypha</i>	8
2.3 <i>Acalypha cuspidata</i> Jacq.....	9
2.4 Proceso para el estudio químico y biológico de los MS.....	13
2.4.1 Técnicas de extracción y separación.....	14
2.4.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	17
2.5 Bioensayos <i>in vitro</i>	21
2.5.1 Actividad antitopoisomerasa.....	21
Capítulo 3. METODOLOGÍA	24
3.1 Procedimientos generales.....	24
3.1.1 Reactivos, consumibles, disolventes y medios de cultivo.....	24
3.1.2 Equipos y materiales en general.....	24
3.1.3 Material biológico para los bioensayos.....	25
3.1.4 Colecta del material vegetal.....	25

3.2	Obtención de extractos de <i>A. cuspidata</i>	25
3.2.1	Preparación de la muestra	25
3.2.2	Obtención de fracciones de hojas-flores (A)	26
3.2.3	Obtención de fracciones de los tallos (B)	28
3.2.4	Obtención de fracciones de raíces (C)	29
3.3	Separación y purificación de compuestos	29
3.3.1	Cromatografía del extracto A ₁ '	30
3.3.2	Cromatografía del extracto A ₁ ''	31
3.3.3	Cromatografía de A ₁ '''	32
3.3.4	Cromatografía de A ₂ '	32
3.3.5	Cromatografía B ₁ '	33
3.3.6	CC de fase reversa del extracto C ₁ '''	33
3.4	Elucidación de estructuras químicas.....	34
3.4.1	Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	34
3.5	Actividad antitopoisomerasa	35
3.5.1	Preparación de los tratamientos y controles.....	35
3.5.2	Activación de cepas	35
3.5.3	Conteo de células para el ajuste de 2 x 10 ⁶ células/mL	35
3.5.4	Aplicación de controles y tratamientos.....	36
3.5.5	Dilución y determinación de células viables	36
3.6	Análisis estadístico	37
Capítulo 4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1	Muestras y obtención de extractos de <i>A. cuspidata</i>	38
4.2	Interpretación de los datos espectroscópicos de RMN.....	39
4.2.1	Espectroscopía de RMN- ¹ H de las fracciones de hojas-flores (A).....	39
4.2.2	Espectroscopía de RMN- ¹ H de las fracciones de tallos (B)	41
4.2.3	Espectroscopía de RMN- ¹ H de las fracciones aisladas de raíz (C)	43
4.2.4	Elucidación estructural de I	44
4.2.5	Elucidación estructural de IIa y IIb.....	48
4.2.6	Elucidación estructural de III.....	51
4.2.7	Elucidación estructural de IVa.....	53

4.2.8	Elucidación estructural de IVb	54
4.2.9	Elucidación estructural de V.....	56
4.2.10	Elucidación estructural de VI	59
4.2.11	Elucidación estructural de VII.....	61
4.2.12	Elucidación estructural de VIII.....	62
4.2.13	Elucidación estructural de IX	64
4.2.14	Elucidación estructural de X.....	67
4.3	Evaluación de la actividad antitopoisomerasa	71
Capítulo 5.	CONCLUSIONES	75
Capítulo 6.	REFERENCIAS	76
Capítulo 7.	APÉNDICE	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
COSY	Espectroscopía de correlación (COSY, por sus siglas en inglés)
CPT	Camptotecina
DEPTQ	Mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización con detección de núcleos cuaternarios (DEPTQ, por sus siglas en inglés)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
EtOH	Etanol
ETP	Etopósido
HI	Halos de inhibición
HMBC	Conectividad heteronuclear a enlaces múltiples (HMBC, por sus siglas en inglés)
HSQC	Coherencia heteronuclear cuántica simple (HSQC, por sus siglas en inglés)
Hx	Hexano
MeOH	Metanol
MS	Metabolitos secundarios
NOESY	Espectroscopía de mejoramiento nuclear de Overhauser (NOESY, por sus siglas en inglés)
<i>R_f</i>	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
UFC	Unidades formadoras de colonia
YPDA	Extracto de Levadura-Peptona-Dextrosa Agar (YPDA, por sus siglas en inglés)
YPDB	Extracto de Levadura-Peptona-Dextrosa Caldo (YPDB, por sus siglas en inglés)

Evaluación de la actividad antitopoisomerasa de compuestos puros de *Acalypha cuspidata* Jacq.

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

Acalypha es el cuarto género más grande de la familia Euphorbiaceae, y en México los estados que tienen mayor diversidad son Oaxaca, Guerrero y Michoacán (Villaseñor, 2016). Estudios fitoquímicos demuestran la presencia de compuestos fenólicos, terpenoides, cumarinas, glucósidos, flavonoides, esteroides, saponinas, taninos, alcaloides, antraquinonas, antocianinas, sesquiterpenos y diterpenos (Fawzy *et al.*, 2017; Seebaluck *et al.*, 2015; Iniaghe *et al.*, 2009). Especies de este género se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas, inflamatorias, diabetes, cáncer, así como, problemas respiratorios. Dada la importancia biológica de los compuestos aislados del género *Acalypha* actualmente compuestos puros y sus extractos han sido patentados como medicamentos, los cuales, se encuentran en el mercado (Mwine y Van, 2011).

Acalypha cuspidata Jacq., conocida comúnmente como hierba de la araña, se usa para tratar enfermedades relacionadas con microorganismos, como varicela, sarampión y ayuda a cicatrizar las heridas rápidamente (Lira-De León *et al.*, 2017; Herrera-Martínez, 2016; Rocha-Gracia *et al.*, 2011). Los estudios biológicos del extracto metanólico y del extracto de acetato de etilo (AcOEt), obtenidos del crudo metanólico, de la parte aérea de *A. cuspidata* descritos por nuestro equipo de trabajo, exhiben actividad antimicrobiana, antioxidante, antitopoisomerasa, antifúngica, capacidad de inducción de apoptosis en células de cáncer de ovario SKOV-3 y actividad antitumoral en el modelo de ratón Nu/Nu (Lira-De León *et al.*, 2017; Rocha-Gracia *et al.*, 2011; Herrera-Martínez, 2010, 2016). Estos reportes muestran el potencial de *A. cuspidata* como una fuente prometedora de compuestos bioactivos con potencial anticáncer. Partiendo de lo anterior, es fundamental el estudio químico de *A. cuspidata*, para caracterizar los compuestos que podrían ser los responsables de las actividades biológicas mencionadas. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue obtener y elucidar las estructuras de los compuestos bioactivos y evaluar la actividad antitopoisomerasa *in vitro*, de subfracciones enriquecidas o compuestos puros.

1.1 Justificación

Los metabolitos secundarios (MS) aislados de plantas pueden tener actividad biológica, característica que los convierte en candidatos de compuestos nuevos con potencial farmacológico, con actividad similar o superior, y en algunos casos con efectos secundarios menores que los tratamientos químicos convencionales. Por lo tanto, las especies vegetales son una fuente importante para el descubrimiento de nuevos fármacos. De acuerdo con estimaciones, solo el 6 % de las aproximadamente 300,000 especies vegetales existentes, han sido investigadas sistemática y farmacológicamente, y alrededor del 15 % han sido estudiadas fitoquímicamente (Cragg y Newman, 2013; Verpoorte, 2000), por lo que hay especies que son fuente importante de compuestos bioactivos naturales. Un ejemplo es *Acalypha cuspidata*, ya que del extracto metanólico y su fracción de AcOEt de la parte aérea para obtención de subfracciones tiene reportes de actividad antimicrobiana (Lira-De León *et al.*, 2017; Rocha-Gracia *et al.*, 2011; Herrera-Martínez, 2010), antioxidante (Lira-De León *et al.*, 2017; Herrera-Martínez, 2010), antipoisomerasa (Lira-De León *et al.*, 2017), antifúngica (Herrera-Martínez, 2010), capacidad de inducción de apoptosis en células de cáncer de ovario SKOV-3 y actividad antitumoral en el modelo de ratón Nu/Nu (Herrera-Martínez, 2016). Partiendo de este último estudio se pueden ligar los antecedentes de la planta: actividad antitopoisomerasa, con la obtención de compuestos con potencial anticáncer. Esto se prevé, debido a que el mecanismo antitopoisomerasa es responsable de la inhibición de la proliferación celular. Así, la obtención de moléculas con actividad antitopoisomerasa representa un gran potencial en el descubrimiento de compuestos anticancerígenos.

Los reportes previos reflejan el potencial de compuestos con impacto farmacológico que puede tener *A. cuspidata*, por lo que es importante aislar, purificar y elucidar los compuestos biológicamente activos. El presente estudio contribuye al conocimiento químico de la especie, permite entender su actividad biológica y propone considerarla como una fuente de compuestos con potencial propiedad anticáncer.

1.2 Relevancia

Por primera vez, se aislaron los compuestos orgánicos de extractos de hojas-flores, tallos y raíces de *A. cuspidata*.

1.3 Hipótesis

A partir de extractos de polaridad intermedia se obtendrán compuestos orgánicos responsables en parte, de la actividad antitopoisomerasa en *A. cuspidata*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Aislar y elucidar las estructuras químicas de los compuestos orgánicos de *A. cuspidata*, desde extractos de hojas-flores, tallos y raíces, y evaluar su actividad antitopoisomerasa de fracciones enriquecidas o compuestos puros.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas los MS presentes en hojas-flores, tallos y raíces de *A. cuspidata*.
2. Elucidar las estructuras químicas de los compuestos orgánicos purificados mediante el análisis de datos adquiridos de técnicas espectroscópicas.
3. Evaluar la actividad antitopoisomerasa *in vitro* de fracciones enriquecidas o compuestos aislados.

1.5 Metas

Objetivo 1

- 1.1 Obtener extractos crudos de hojas-flores, tallos y raíces de *A. cuspidata* con disolventes de polaridad distinta usando extracción asistida por ultrasonido.
- 1.2 Realizar particiones de los extractos crudos, con disolventes orgánicos apropiados para obtener fracciones de menor complejidad.
- 1.3 Obtener compuestos puros o fracciones enriquecidas, de hojas-flores, tallos y raíces de *A. cuspidata* mediante cromatografía en columna abierta (CC).

Objetivo 2

2.1 Obtener los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de los componentes puros y fracciones enriquecidas.

2.2 Caracterizar e identificar los compuestos orgánicos mediante la interpretación y análisis de los datos espectroscópicos.

Objetivo 3

3.1 Evaluar la actividad antitopoisomerasa *in vitro* de camptotecina (CPT) y etopósido (ETP) como controles positivos utilizando las cepas JN394 y JN362a de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 Determinar la actividad antitopoisomerasa *in vitro* utilizando las cepas JN394 y JN362a de *S. cerevisiae* de las fracciones enriquecidas o compuestos puros obtenidos de *A. cuspidata*.

1.6 Limitaciones de la tesis

La actividad antitopoisomerasa, se evaluó con fracciones libres de ftalatos y compuestos puros, aislados de *A. cuspidata*, de los cuales se obtuvieron, al menos tres miligramos de cada uno.

Capítulo 2. MARCO TEÓRICO

Las plantas, hongos, bacterias y algas, representan un reservorio de MS, también denominados productos naturales (Brusotti *et al.*, 2014). Los MS son biomoléculas de peso molecular bajo consideradas no esenciales para la vida del organismo productor, contrario a los metabolitos primarios (Agostini-Costa *et al.*, 2012). Estas moléculas orgánicas se producen en una secuencia de reacciones anabólicas como catabólicas catalizadas por enzimas y controlados por factores bióticos y abióticos, que se conocen como metabolitos secundarios. Se considera que los MS son producidos por necesidades propias del organismo para la sobrevivencia, adaptación al medio ambiente, como generación de compuestos de desecho y probablemente para otras actividades aún desconocidas. Según las rutas biosintéticas, los MS son agrupados en tres familias químicas principales: alcaloides, terpenos y compuestos fenólicos (Brusotti *et al.*, 2014).

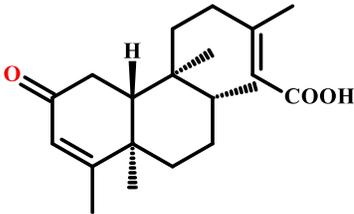
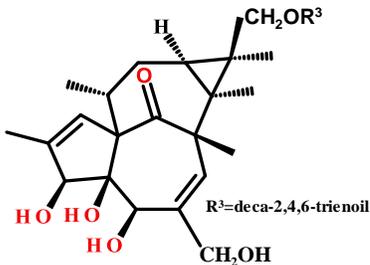
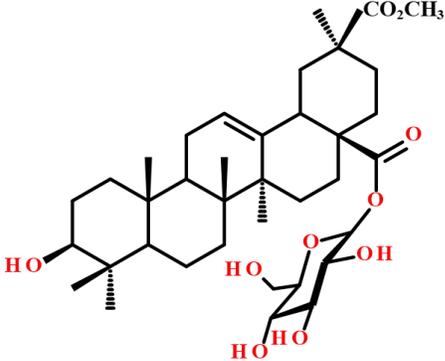
2.1 Familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae es una de las más diversas en México, conformada por 714 especies, se ubica como la quinta familia más grande del reino vegetal (Villaseñor, 2016), está integrada por especies desde arbustos y herbáceas, hasta árboles grandes. La familia Euphorbiaceae se halla distribuida en zonas tropicales y subtropicales ampliamente. Esta familia presenta una diversidad de MS, algunos como los ésteres de forbol presentan efectos tóxicos, pero útiles, ya que poseen actividad antimicrobianas, antitumorales y propiedades molusquicidas e insecticidas (Goel *et al.*, 2007).

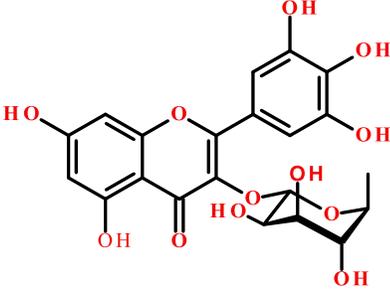
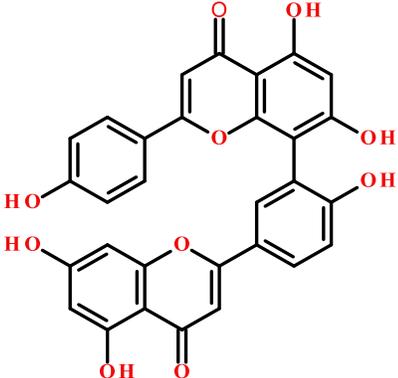
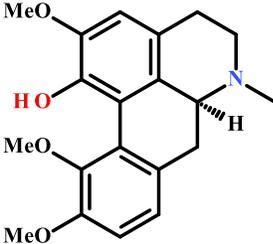
Estudios fitoquímicos de esta familia evidencian la presencia de una gran variedad de MS con potencial terapéutico, los principales son terpenos como el casbeno (diterpeno) (Kirby *et al.*, 2010). Otros son ésteres de alcoholes diterpénicos, los cuales han mostrado actividad antitumoral significativa (Baloch *et al.*, 2005). También hay reportes de triterpenos con actividad antimicrobiana (Awanchiri *et al.*, 2009). Los flavonoides son otro grupo importante, tales como la afzelina, quercitrina y miricitrina mostraron actividad contra *Plasmodium falciparum* con un IC₅₀ de 1.1, 4.1, 5.4 µg/mL, respectivamente (Liu *et al.*, 2007). Otros compuestos descritos en esta familia son fenoles simples, taninos, aminas y quinonas (Falodun *et al.*, 2008; Payo *et al.*, 2001). Los

alcaloides también se encuentran presentes, tal es el caso de corydina, norisoboldina (Ravanelli *et al.*, 2016; Payo *et al.*, 2001) y derivados de quinolizidina (Rizk, 1987) aislados del género *Croton*. Lo anterior ha resultado que diversos compuestos y extractos aislados han sido patentados como medicamentos por ejemplo como anticancerígeno con patente US 6923923 o antiinflamatorio con patente US 2007/0248694 A1 (Mwine y Van 2011). En el Cuadro 1 se muestran algunos ejemplos de MS aislados de la familia Euphorbiaceae.

Cuadro 1. MS aislados de la familia Euphorbiaceae.

MS	Actividad	Compuestos reportados
	Antifúngica	 <p>Ácido 2-oxokolavénico (Salah <i>et al.</i>, 2003)</p>
Diterpeno	Antitumoral	 <p>17-[(2Z, 4E, 6Z)-deca-2, 4, 6-trienoiloxi] ingenol (Baloch <i>et al.</i>, 2005)</p>
Terpenos	Anti-microbiana	 <p>28-β-D-Glucopiranosil-30-metil-3-β-hidroxiolean-12-en-28,30-dioato (Awanchiri <i>et al.</i>, 2009)</p>

Cuadro 1. (Continuación)

MS	Actividad	Compuestos reportados
Compuestos fenólicos	Flavonoides	Antimalaria
		
		<p>Miricitrina (Liu <i>et al.</i>, 2007)</p>
		Antioxidante
		
		<p>Amentoflavona (3', 8''-biapigenina) (Kassem <i>et al.</i>, 2013)</p>
Alcaloides	Derivado de isoquinolina	Anti-VIH
		
		<p>Corydina (Ravanelli <i>et al.</i>, 2016).</p>

2.2 Género *Acalypha*

Acalypha es el cuarto género más grande de la familia Euphorbiaceae con 108 especies. Los estados con mayor diversidad en México de este género son Oaxaca, Guerrero y Michoacán (Villaseñor, 2016). Muchas especies de *Acalypha* se usan como plantas medicinales, otras se usan como insecticidas, repelentes y en veterinaria. (Seebaluck *et al.*, 2015). Así mismo, se encontró que las especies de *Acalypha* utilizadas tradicionalmente poseen al menos una de las actividades biológicas siguientes: antimicrobiana, antidiabética, antioxidante, antiinflamatoria, anticancerosa, leishmanicida, antihiper glucemiante, antihipertensiva, analgésica, antihelmíntica, entre otras.

Por ejemplo, el extracto metanólico de la parte aérea *A. integrifolia* mostró una actividad antibacteriana significativa contra *E. coli* (CMI = 0.06 mg/mL) (Seebaluck-Sandoram *et al.*, 2017). Por otra parte, el extracto crudo de CH₂Cl₂ de *A. platyphilla* presentó la actividad antioxidante mayor (IC₅₀ = 111.99 mg/L) que el control positivo, la hidroquinona (IC₅₀ = 151.19 mg/L) (Mosquera *et al.*, 2007). Mientras tanto, los extractos de AcOEt y Hx de *A. wilkesiana* desencadenaron apoptosis en células de glioma humano (IC₅₀ = 28.03 ± 6.44 µg/mL) y carcinoma de pulmón humano (IC₅₀ = 89.63 ± 2.12 µg/mL) mediante rupturas en el ADN de una y de doble hebra (Lim *et al.*, 2011), debido a que estos extractos no tuvieron efectos citotóxicos en células normales, se pueden considerar como agente citotóxicos para las líneas celulares evaluadas.

Estudios químicos de este género reportan la presencia de compuestos como: flavonoides, cumarinas, antocianinas, taninos, esteroides, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, aceites esenciales, saponinas y alcaloides (Fawzy *et al.*, 2017; Seebaluck *et al.*, 2015; Iniaghe *et al.*, 2009).

En el Cuadro 2, se muestran algunos ejemplos de MS aislados en este género.

Cuadro 2. Especies de *Acalypha* empleadas en la medicina tradicional mexicana y sus MS.

Especie	Uso medicinal	Actividad biológica	MS	Compuestos reportados
<i>A. monostachya</i> Cav.	Para aliviar erupciones en la piel, enfermedades de origen bacteriano y fúngico	Antioxidante Antibacteriana Antifúngica	flavonas, flavanona, flavonol, ácidos grasos y sus ésteres, terpenos	Vitamina E; fitol; éster metílico del ácido linolénico, del ácido linoleico y del ácido palmítico; octadecanal (Canale <i>et al.</i> , 2011; Macías <i>et al.</i> , 2009)
<i>A. phleoides</i> Cav.	Para aliviar molestias gastrointestinales	Antiespasmódica Antiprotozoaria	Monoterpenos	Timol, alcanfor, γ -terpineno (Astudillo <i>et al.</i> , 2004; Calzada <i>et al.</i> , 1998)
<i>A. alopecuroides</i> Jacq.	Infecciones de la piel y asma	Actividad inhibidora sobre la activación de NF- κ B Antiinflamatorio	No descrito	No descrito (Bork <i>et al.</i> , 1997)

2.3 *Acalypha cuspidata* Jacq.

Esta especie es conocida comúnmente como Jabachopo o hierba de la araña, Figura 1, sus tallos y hojas son útiles para tratar las infecciones de la piel (Lira-De León *et al.*, 2017), en enfermedades como la varicela y el sarampión (Rocha-Gracia *et al.*, 2011) y para cicatrizar rápidamente las heridas de la piel (Herrera-Martínez, 2016).

A. cuspidata es un arbusto que puede alcanzar alturas de hasta 1.5 m de altura, monoico, con ramas delgadas, tiene estípulas de 3-4 mm de largo, ensanchadas en la base y pubescentes. El peciolo es de 2-5 cm de largo. Láminas foliares de 4-12 x 2.5-8 cm de largo, de ovadolanceolada a subtriangular-lanceoladas, con base obtusa a cordada, ápice

de acuminado a cuspidato-acuminado, margen aserrado o crenado aserrado, haz con pústulas diminutas, nerviación palmeada. Inflorescencias espiciformes axilares, de coloración verde blanquizca, su época de floración abarca del mes de junio hasta agosto (Sanz *et al.*, 1994).



Taxonomía

Reino:	Plantae
Filo:	Mangoleophyta
Clase:	Mangoliopsida
Orden:	Malpighiales
Familia:	Euphorbiaceae
Género:	<i>Acalypha</i>
Especie:	<i>A. cuspidata</i> Jacq.

Figura 1. Parte aérea de *A. cuspidata* Jacq. y su clasificación taxonómica.

Entre los estudios biológicos para esta especie se encuentra la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de la parte aérea. Se evaluó contra cinco cepas de *Staphylococcus* (HI = 6.25-10.25 mm, 50 mg/mL) resistentes a la meticilina (HI =10 mm, 10 µg/mL) (Rocha-Gracia *et al.*, 2011). De la extracción con AcOEt se obtuvieron subfracciones que mostraron inhibición del crecimiento de *S. epidermidis* a concentraciones de 10 mg/mL con HI = 24.5, 23.5, 21.5, 20.5, 20.3 mm, y una de ellas con HI = 26.3 mm, actividad similar al cloranfenicol (control positivo, HI = 25.9 mm a 1.193 mg/mL) (Herrera-Martínez, 2010). Para *S. aureus*, se reporta un valor de concentración mínima inhibitoria de 97.65 µg/mL (Lira-De León *et al.*, 2017), también se encontró que *A. cuspidata* tiene

potencial como agente contra el cáncer, ya que el extracto metanólico de la parte aérea (100 mg/mL) presentó actividad antitopoisomerasa (JN394, -71.23 ± 2.12 % y JN362a, 84.69 ± 3.54 %).

Del extracto AcOEt se obtuvieron fracciones y subfracciones que contienen inhibidores de las enzimas topoisomerasas I y II, a concentraciones parecidas a los controles positivos. Por ejemplo, una fracción, conteniendo 4 o 5 compuestos, mostró inhibición de 99.07 ± 0.89 % a $154 \mu\text{g/mL}$, mientras que los controles positivos mostraron inhibición semejante a camptotecina (CPT) 100 ± 0.0 a $50 \mu\text{g/mL}$ y 99.76 ± 0.42 % a $100 \mu\text{g/mL}$ de etopósido (ETP), los resultados se muestran en la Figura 2.

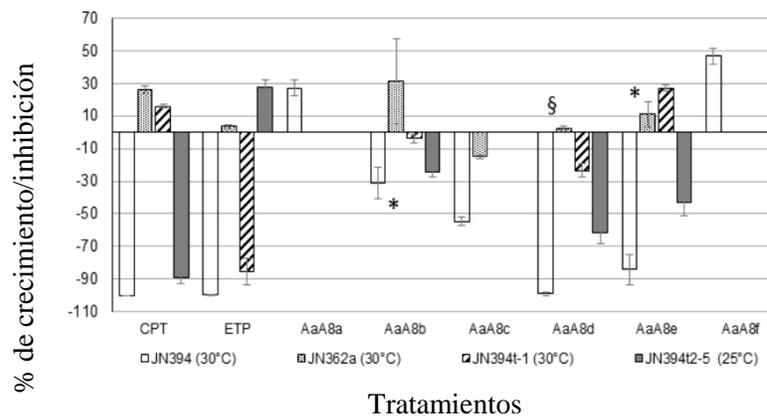


Figura 2. Porcentaje de crecimiento e inhibición de la actividad antitopoisomerasa de *A. cuspidata*. Controles de referencia: CPT ($50 \mu\text{g/mL}$) y ETP ($100 \mu\text{g/mL}$). Subfracciones: AaA8a y AaA8b ($154 \mu\text{g/mL}$), AaA8c ($213 \mu\text{g/mL}$), AaA8d y AaA8e ($154 \mu\text{g/mL}$) y AaA8f ($63.9 \mu\text{g/mL}$). Extraída de Lira-De León *et al.* (2017).

Herrera-Martínez (2016) demostró el efecto de *A. cuspidata* sobre células de cáncer de ovario SKOV-3 de los extractos metanólicos y de AcOEt de la parte aérea, este último mostró un efecto mayor ($\text{IC}_{50} = 86.5 \mu\text{g/mL}$) que el extracto de MeOH ($\text{IC}_{50} = 139.2 \mu\text{g/mL}$), Figura 3.

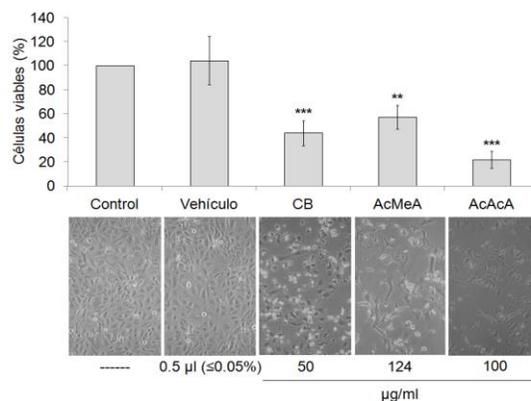


Figura 3. Porcentaje de inhibición del extracto metanólico y de AcOEt de *A. cuspidata*, donde: sin tratamiento (control), con el vehículo (DMSO), carboplatino (CB), extracto metanólico (AcMeA) y extracto de AcOEt (AcAcA). Extraída de Herrera-Martínez, 2016.

Posteriormente, el extracto de AcOEt se cromatografió en columna abierta con fase normal (SiO_2) usando como fase móvil una mezcla de Hx/AcOEt incrementándose la polaridad consecutivamente hasta llegar al 100 % de AcOEt y MeOH, se obtuvieron 11 fracciones (F1-F11). Las fracciones 4-7 obtenidas con una mezcla de disolvente desde 9:1 a 7:3 (Hx/AcOEt), presentaron un efecto inhibitorio mucho mayor que el resto de las fracciones ($\text{IC}_{50} = 33.01 \pm 3.37$; 23.87 ± 1.92 ; 13.26 ± 10.41 y 27.78 ± 2.86 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). La fracción F7 (50 $\mu\text{g/mL}$, obtenida con 7:3, Hx/AcOEt) fue la única que tuvo un efecto selectivo sobre SKOV-3, y disminuyó el tamaño de los tumores inducidos de SKOV-3 en ratones Nu/Nu mediante el daño a mitocondrias, Figura 4. Además, no se observó efecto tóxico sobre células no cancerígenas de epitelio de pulmón humano transformado BEAS-2B (ETCC CLR-9609), tampoco en células de hepatocito de rata, tratadas con vehículo y carboplatino (50 $\mu\text{g/mL}$) cada uno.

Posteriormente al subfraccionar F7 se obtuvieron tres fracciones (SF1-SF3). La fracción SF2 presentó mayor efectividad ($\text{IC}_{50} = 6.75$ $\mu\text{g/mL}$) que las otras dos subfracciones ($\text{IC}_{50} = 122.5$ y 15 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) sobre las células SKOV-3.

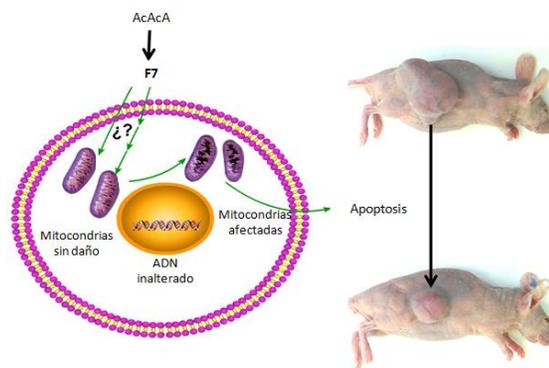


Figura 4. Esquema del mecanismo de acción de la fracción activa (F7) de *A. cuspidata* sobre células de cáncer de ovario SKOV-3. Los compuestos presentes en dicha fracción no afectaron la síntesis de ADN, indujeron apoptosis y daño a mitocondrias. Modificada de Herrera-Martínez (2016).

2.4 Proceso para el estudio químico y biológico de los MS

En el estudio sistemático de los MS de especies vegetales, el aislamiento, elucidación estructural y la determinación de la bioactividad, representan un proceso complejo, el cual comienza con la identificación, colecta y preparación del material vegetal. Posteriormente se aplican técnicas de extracción, separación y caracterización del MS, y por último se realizan las pruebas de actividad biológica *in vitro* y/o *in vivo*.

Este proceso es desafiante puesto que la obtención de un MS está limitada por su porcentaje de recuperación, ya que se encuentran en mezclas generalmente son biosintetizados en cantidades pequeñas; por ejemplo, para la obtención de 1 g de taxol, fármaco anticancerígeno extraído de la corteza de *Taxus brevifolia*, se requiere corteza de aproximadamente tres árboles (Dewick, 2009).

En la Figura 5, se esquematiza el proceso ya descrito.



Figura 5. Etapas del proceso que presenta el estudio químico y biológico de los MS.

Por lo general, la recolección de las plantas se realiza directamente en su hábitat natural mediante criterios aleatorios, etnofarmacológicos, quimiosistemáticos y/o ecológicos, en donde es importante una identificación botánica correcta de la especie (Bucar *et al.*, 2013). Una vez colectado el material vegetal, éste se seca y se fragmenta o se disminuye el tamaño de partícula por molienda, para posteriormente hacer la extracción con algún disolvente.

2.4.1 Técnicas de extracción y separación

Las técnicas de extracción de MS se pueden clasificar en tradicionales y modernas (Brusotti *et al.*, 2014), Figura 6.

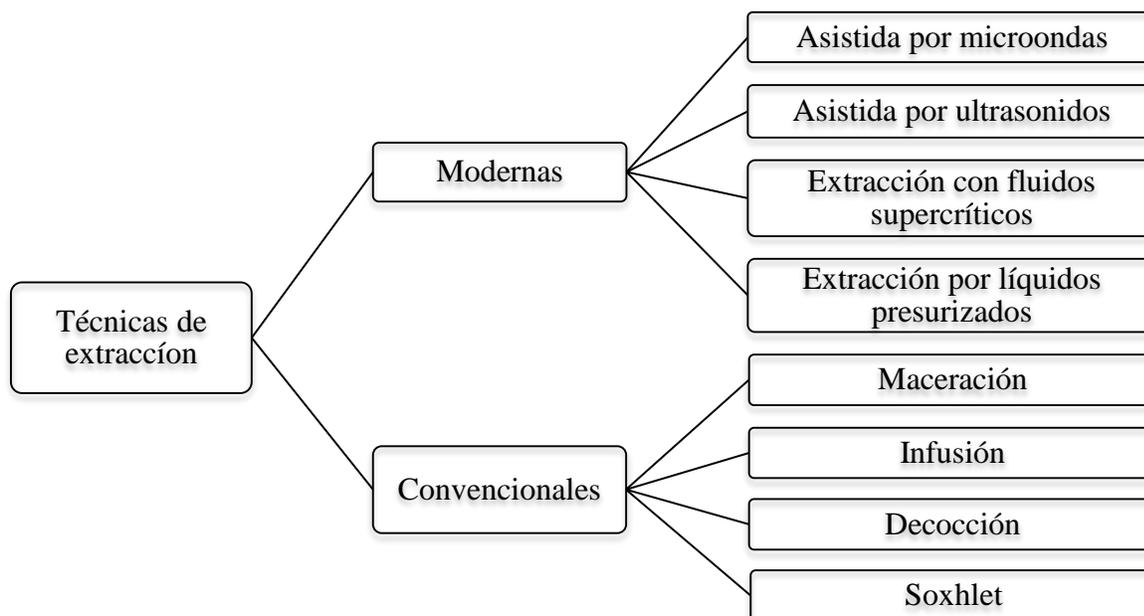


Figura 6. Técnicas de extracción de MS.

La maceración es una extracción sólido-líquido y es utilizado ampliamente. El material vegetal (muestra) que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el disolvente seleccionado (Verde-Star *et al.*, 2016). Entre los disolventes más usados se encuentran H_x, CH₂Cl₂, AcOEt, MeOH y EtOH (Brusotti *et al.*, 2014), sin embargo, generalmente se suelen utilizar MeOH o EtOH acuosos al 70 % ya que son adecuados para extraer una gama amplia de moléculas bioactivas (Atanasov *et al.*, 2015). En la extracción asistida

por ultrasonido (EAU), a diferencia de la maceración, se disminuye el tiempo de extracción, también mejora el rendimiento debido a la tensión mecánica que induce cavitaciones y degradación celular (Bucar *et al.*, 2013) gracias a los pulsos de alta frecuencia (20 kHz). La eficiencia de la extracción depende de la frecuencia y temperatura de sonicación (Satyajit *et al.*, 2006), así como también de la naturaleza de los MS. Posteriormente de la extracción, el sobrenadante se separa por decantación y filtración simple, el disolvente se elimina generalmente a presión reducida en un rotavapor, para obtener el extracto crudo correspondiente. Antes de someter el extracto crudo a pruebas cromatográficas, conviene realizar un pre-tratamiento. La partición tradicional líquido-líquido utilizando disolventes orgánicos de diferentes polaridades y la extracción en fase sólida pueden utilizarse, esto con la finalidad de eliminar metabolitos que interfieren, como lípidos, pigmentos y taninos, entre otros (Brusotti *et al.*, 2014).

Por otra parte, la cromatografía es una técnica que permite separar, identificar y/o monitorear los componentes de una mezcla. Existen diversos tipos de cromatografía dependiendo de los soportes y el eluyente usado. En general, se efectúa haciendo pasar una fase móvil continuamente, sobre una segunda, que permanece fija (estacionaria). Posteriormente, la muestra se coloca y a medida que se desplaza con la fase móvil, los componentes de la muestra se reparten o distribuyen entre ambas fases (Harvey, 2000). El reparto entre las fases ocurre por las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra. Cuando se emplea una fase estacionaria polar y una móvil no polar, se favorece la retención de compuestos polares y la elución de compuestos no polares, entonces a esta cromatografía se le conoce como de fase normal. Mientras que en la cromatografía de fase reversa hay una polaridad invertida entre la fase móvil y fase estacionaria en comparación con la cromatografía en fase normal, por lo que los solutos no polares serán retenidos y los polares eluidos. La cromatografía también puede dividirse de acuerdo a la forma de su desarrollo por ejemplo cromatografía en placa fina y cromatografía en columna, Figura 7 (Harvey, 2000).

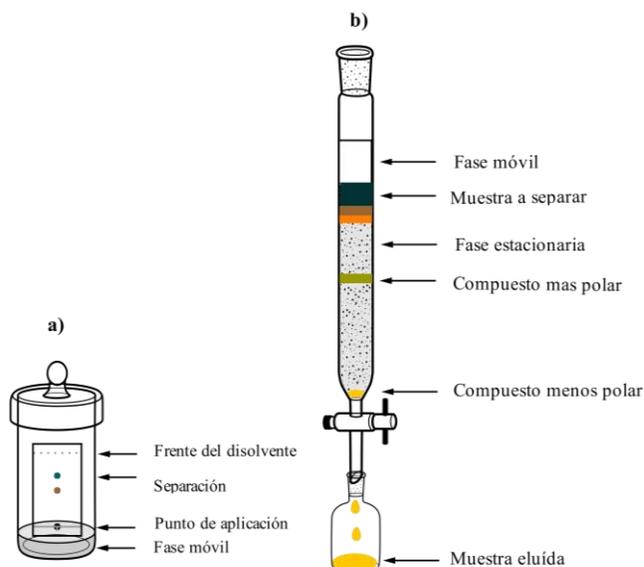


Figura 7. a) Cromatografía en placa fina (CCF) y b) Cromatografía en columna abierta (CC, fase normal).

Cromatografía en placa fina (CCF): Es una forma de cromatografía sólido-líquido, utilizada ampliamente debido a su simplicidad y sensibilidad alta para un análisis rápido de la naturaleza de los compuestos presentes en el extracto crudo o en fracciones. La información obtenida de estos resultados permite realizar la elección adecuada de la fase estacionaria y continuar con la separación. También permite determinar el grado de pureza de los compuestos o identificarlos tentativamente, antes o después de someterlos a un tipo de cromatografía. La CCF, que es una cromatografía plana, se realiza generalmente en una capa de un material adsorbente por lo general gel de sílice o celulosa (fase estacionaria) que se encuentra sobre una lámina de aluminio, posteriormente se aplica la muestra en la base y la placa se coloca en una cámara de elución que contiene una pequeña cantidad de disolvente o mezcla que actúan como fase móvil (eluyente), Figura 7a. Cuando el eluyente alcanza un punto aproximadamente a 5 mm de la parte superior de la placa, esta es retirada de la cámara (Rashid *et al.*, 2017). La detección de los compuestos se realiza a simple vista, con luz UV ($\lambda = 254$ o 365 nm) y/o uso de diversos reactivos de detección (oxidantes tales como sulfato cérico amoniacal, ácido clorhídrico, reactivo de Dragendorff, entre otros). Los compuestos presentes aparecen como puntos separados verticalmente, cada uno tiene un factor de retención (R_f) que es el

cociente obtenido por la distancia recorrida del compuesto entre la distancia recorrida por la fase móvil desde el punto de aplicación, se puede determinar mediante la Fórmula 1.

$$\text{Fórmula 1: } R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por la fase móvil}}$$

Cromatografía en columna abierta (CC): La fase estacionaria se introduce en una columna de vidrio vertical a través de la cual pasa la fase móvil, por efecto de la gravedad o una presión aplicada. Las ventajas que presenta este método sobre la CCF es que permite separar cantidades grandes de muestra, se pueden realizar cambios secuenciales de polaridad del disolvente de elución, lo que mejora la eficiencia de separación (Lamarque *et al.*, 2008). La muestra (previamente disuelta o soportada en la fase estacionaria) se añade cuidadosamente por el extremo superior de la columna (previamente compactada), posteriormente con la adición de fase móvil se lleva a cabo la separación de los componentes a distintas velocidades, dependiendo de la magnitud de sus interacciones entre ambas fases, Figura 7b. Por lo tanto, los compuestos que son retenidos fuertemente por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil, contrario a los que se unen débilmente. Los compuestos salen separados si se ha logrado la resolución de los analitos de la columna y se recogen en fracciones, para determinar el grado de pureza de las fracciones obtenidas, se analizan por CCF (Verde-Star *et al.*, 2016; Lamarque *et al.*, 2008).

Una vez obtenidos los compuestos se efectúa la elucidación estructural mediante el análisis de los datos de infrarrojo (IR), de masa (EM) y de resonancia magnética nuclear (RMN), principalmente. A continuación, se describe esta última técnica.

2.4.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La RMN es una de las herramientas espectroscópicas más útil para elucidar la estructura química de moléculas. Permite determinar el entorno electrónico y magnético de átomos cuyos núcleos son magnéticamente activos por poseer un espín nuclear diferente de cero. Los núcleos más estudiados son los de ^1H y ^{13}C debido a que son los componentes principales de los compuestos orgánicos. La abundancia natural del ^1H es de 99.98 % por lo que se favorece la obtención de espectros de RMN- ^1H en tiempos cortos, a diferencia

de la obtención de espectros de ^{13}C , cuya abundancia natural es de 1.1 % por lo que los espectros de ^{13}C requieren mayores cantidad de muestra y tiempo de obtención que los núcleos de ^1H .

Cuando una muestra se somete a un campo magnético externo altamente homogéneo y a una radiofrecuencia (rf) los núcleos absorben energía y se produce una inversión de su espín a frecuencias que dependen de la diferencia de energías (ΔE) entre los estados de espín α y β , Figura 8. Y cuando los estados de espines de mayor energía β , regresan a su estado basal emiten energía que el espectrómetro de RMN detecta, y las muestra en forma de una gráfica de frecuencia de señal contra intensidad después de una transformada de Fourier (Yurkanis, 2008).

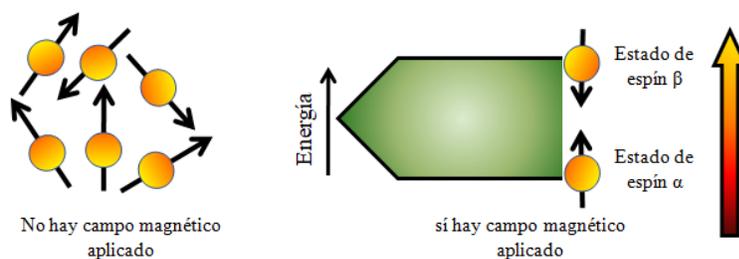


Figura 8. Los momentos magnéticos de los núcleos tienen orientación aleatoria en ausencia de un campo magnético aplicado. Mientras que en presencia de un campo magnético externo altamente homogéneo los momentos magnéticos de los núcleos se alinean a favor o en contra del campo magnético externo.

La frecuencia de absorción no es la misma en todos los núcleos de ^1H o ^{13}C de determinado compuesto, debido a que cada núcleo está rodeado por una nube de electrones que protege (protección diamagnética) parcialmente contra el campo magnético aplicado. Adicionalmente, los electrones vecinos también alteran el campo magnético, por lo tanto, la frecuencia de resonancia de un núcleo está en función de su ambiente químico y electrónico. Esto es muy útil para determinar la estructura química de la molécula de interés. Los protones en ambientes pobres en electrones están menos protegidos y aparecen a frecuencias mayores (hacia el lado izquierdo del espectro) contrario con los ricos en electrones (Yurkanis, 2008). El desplazamiento químico (δ), expresado en ppm, es una medida relativa de las frecuencias de resonancia, utilizando como referencia al tetrametilsilano [TMS; $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$]. Conjuntamente existe otra variable

útil para determinar la estructura a partir de un espectro RMN, este es el acoplamiento medido a través de la constante de acoplamiento (J) en Hz, este acoplamiento da información sobre el ambiente de los núcleos de hidrógeno observados debido a que permite conocer la vecindad de otros núcleos activos.

Generalmente el δ para ^{13}C (δ_{C}) se encuentra en un intervalo de 0 a 220 ppm, mientras que para ^1H (δ_{H}) entre 0 a 12 ppm, Figura 9.

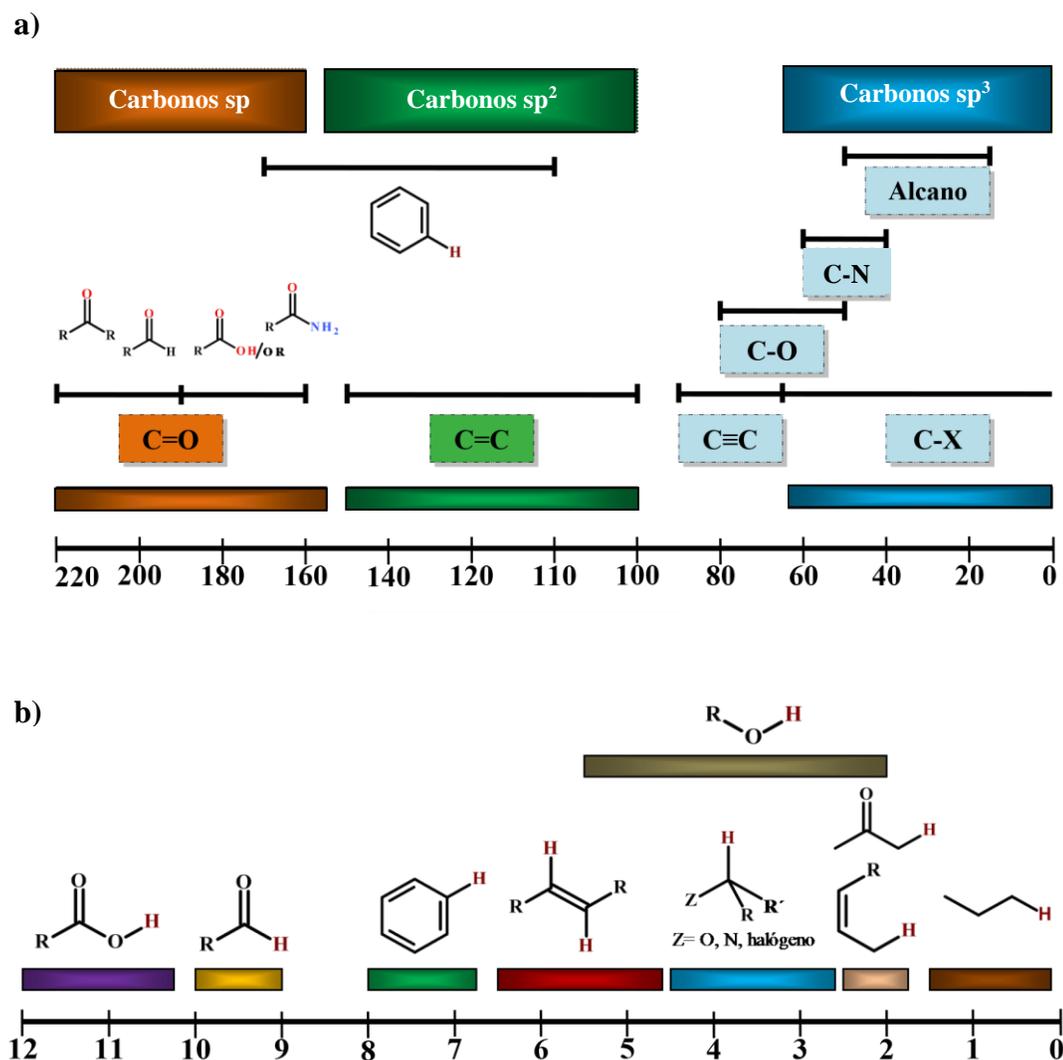


Figura 9. a): Intervalo de los desplazamientos químicos, δ (ppm) para átomos de ^{13}C en entornos químicos diversos. **b):** Intervalo de los desplazamientos químicos, δ (ppm) para ^1H en entornos químicos diversos.

Espectroscopía de RMN bi-dimensional.

Los experimentos 2D homonucleares (^1H - ^1H) más usados son: COSY (COrrelation SpectroscopY, por sus siglas en inglés), en este experimento la magnetización es transferida por acoplamiento escalar, por lo que pueden identificarse acoplamientos entre átomos de hidrógenos a los cuales los separan dos y tres enlaces, porque las constantes de acoplamiento 4J son cercanas a cero. NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY, por sus siglas en inglés), con esta técnica se obtiene una diagrama con el que es posible determinar que átomos de hidrógenos de una molécula se aproximan de manera apreciable entre sí en el espacio, independientemente del número de enlaces que haya entre ellos, ya que la transferencia de magnetización es lleva de manera trasversal y posteriormente longitudinal.

En cuanto a los experimentos heteronucleares (^1H - ^{13}C) se encuentran: El experimento HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) se usa para determinar las correlaciones entre protón y carbono que se encuentran unidos directamente a través de un enlace. En cambio el experimento HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) se observan correlaciones entre los protones y carbonos que están separados de dos a tres enlaces, mediante una mezcla de magnetización trasversal de los espines acoplados, que evoluciona coherentemente y no directamente.

Los compuestos a identificar se solubilizan en un disolvente deuterado, de esta manera, se evita el solapamiento de las señales intensas emitidas por los hidrógenos del disolvente. Adicionalmente la resonancia del deuterio sirve para el ajuste y estabilización (*lock*) del campo magnético.

La información generada por los espectros de RMN de la estructura molecular se resume en los siguientes parámetros fundamentales (Butnariu, 2016):

- a. Número de señales: Indica cuántos tipos de protones hay en la molécula.
- b. Posición de la señal: Establece la naturaleza de los protones presentes (alifático, alqueno, aromático, bencílico, hidroxílico, aldehídico, entre otros).
- c. Intensidad relativa de la señal: El área bajo la curva (la integral) es proporcional al número de protones que le dan origen.

- d. Multiplicidad: La apariencia de las señales en RMN-¹H depende de un fenómeno conocido como acoplamiento de espines (acoplamiento escalar) y origina que las señales se desdoblén.

2.5 Bioensayos *in vitro*

La importancia de los MS radica principalmente en la propia función biológica y el potencial que representan para algunas industrias, por lo que, finalmente los compuestos puros, los extractos crudos y/o parcialmente purificados se someten a pruebas biológicas *in vitro* y/o *in vivo*. Los bioensayos *in vitro*, permiten evaluar una cantidad grande de muestras en un lapso de tiempo relativamente corto (Brusotti *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos de estos bioensayos permiten determinar la presencia de compuestos presentes en el extracto o fracción en estudio. Los bioensayos también proporcionan información sobre la toxicidad o especificidad del compuesto. Respecto a la toxicidad está el indicador de crecimiento celular como la concentración mínima inhibitoria sobre la actividad antimicrobiana, y en cuanto a la especificidad hay pruebas que evidencian los mecanismos de acción de los compuestos, ejemplo de ello son aquellos anticancerígenos que inhiben enzimas, como las topoisomerasas.

A continuación se describen los fundamentos teóricos de la actividad antitopoisomerasa, evaluada en este trabajo.

2.5.1 Actividad antitopoisomerasa

Las topoisomerasas (TOP) son enzimas encargadas de relajar la tensión torsional del ADN durante los procesos celulares normales. Las TOP se dividen en dos tipos, dependiendo de la forma en que cortan y unen el ADN. Las tipo I escinden una hebra de ADN y las tipo II, cortan ambas cadenas, mediante un ataque nucleofílico de un residuo catalítico de tirosina que se une al extremo fosfato del corte del ADN, Figura 10 (Pommier *et al.*, 2010).

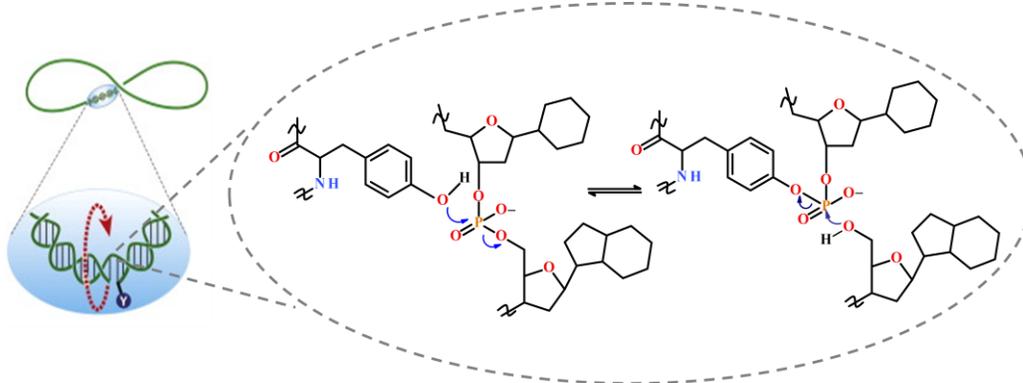


Figura 10. Catálisis de la rotura transitoria de ADN por las topoisomerasas (TOP). El OH de una tirosina ataca al fósforo del ADN formando un enlace covalente fosfotirosina (rompe en enlace fosfodiéster del ADN). Modificado de Pommier *et al.* (2010).

La función que tienen estas enzimas es fundamental para la supervivencia celular. Debido a que las TOP se han encontrado en niveles elevados en células cancerosas en comparación con las células normales, éstas se han convertido en blancos terapéuticos antitumorales (Monsalve-Abaca, 2012; Pommier *et al.*, 2010).

Los inhibidores dirigidos a las TOP, se han clasificado en dos clases principales: venenos (I y II) y catalíticos (I y II). Los venenos matan a las células atrapando complejos de escisión, mientras que los supresores inhiben la catálisis (Pommier *et al.*, 1998). Los agentes anticancerosos usados comúnmente como controles en la evaluación antitopoisomerasa son camptotecina (CPT), inhibidor de la TOP I, y etopósido (ETP), inhibidor de la TOP II, Figura 11.

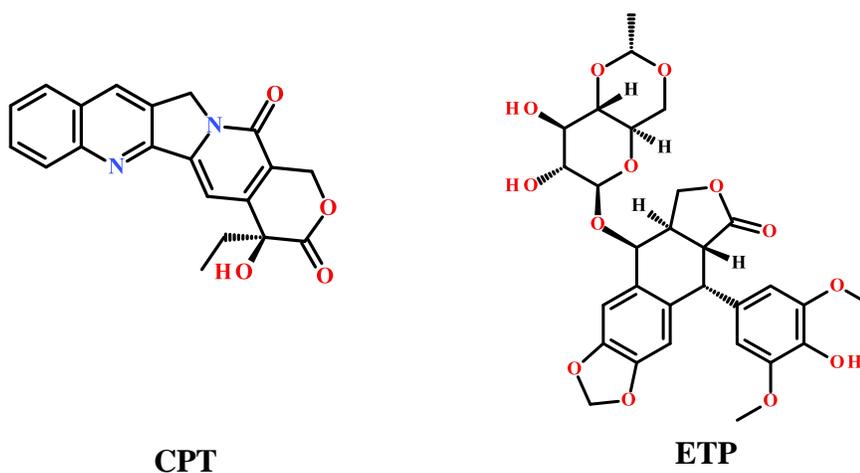


Figura 11. Estructura química de camptotecina (CPT) y etopósido (ETP).

Para determinar la actividad antitopoisomerasa se emplean dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que difieren en sus genotipos, Cuadro 3. La disrupción génica del gen *rad52* por la integración con el gen *LEU2* en la cepa JN394 le da sensibilidad mayor a la célula ante compuestos con posible actividad antitopoisomerasa porque crea deficiencia en la reparación del rompimiento de la doble cadena de ADN. Por el contrario, la cepa JN362a al no tener esa disrupción génica es resistente a los compuestos que dañan el material genético (Gunatilaka *et al.*, 1994; Nitiss y Wang, 1988). Los compuestos antitopoisomerasa deben inhibir el crecimiento de JN394, pero no afectar el crecimiento de JN362a.

Cuadro 3. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas genéticamente usadas para evaluar actividad antitopoisomerasa.

Cepa	Descripción	Genotipo
JN394	Deficiente de reparar el ADN	<i>Mata ura3-52 leu2 trp1 his7 ade1-2 ISE2 rad52::LEU2</i>
JN362a	Capaz de reparar el ADN	<i>Mata ura3-52 leu2 trp1 his7 ade1-2 ISE2</i>

*Modificada de Ramírez-Mares *et al.* (2004).

Capítulo 3. METODOLOGÍA

En esta sección se describe la separación de MS presentes en hojas-flores (A), tallos (B) y raíces (C) de *A. cuspidata* mediante cromatografías de fase normal y reversa. A continuación, se enlistan los equipos, reactivos y disolventes que se usaron, también las técnicas empleadas para la separación, caracterización e identificación de compuestos presentes en *A. cuspidata*, así como, la evaluación de su actividad antitopoisomerasa.

3.1 Procedimientos generales

3.1.1 Reactivos, consumibles, disolventes y medios de cultivo

Los disolventes utilizados fueron EtOH, MeOH, CH₂Cl₂, AcOEt, acetona y Hx (Conquimex, 95 %) se usaron después de una destilación fraccionada; otros reactivos empleados fueron: piridina, NaHCO₃, HCl acuoso al 10 %, carbón activado (J.T. Baker), anhídrido acético, gel de sílice (230-400 mallas), C₁₈, NaCl (Merck), amberlita XAD16N (20-60 mallas), sulfato cérico amoniacal (NH₄)₄Ce(SO₄)₄•2H₂O, Na₂SO₄ (MEYER®), anhídrido acético (Sigma-Aldrich), H₂O (desionizada y sonicada). Para los experimentos de RMN se usaron cloroformo-*d*, DMSO-*d*₆, metanol-*d*₄ y piridina-*d*₅ con pureza isotópica de 98 % (Sigma-Aldrich). Para la actividad antitopoisomerasa se usaron, medios de cultivo marca Bacto™: agar Bacto, extracto de levadura, peptona y agar dextrosa sabouraud; además de sal de adenina (Sigma-Aldrich), NaCl, azul de tripano (Baker), CPT (Sigma-Aldrich), ETP (Sigma-Aldrich) y DMSO (Hybri-Max).

3.1.2 Equipos y materiales en general

Molino ciclónico (Foss Cyclonic Cyclotec™ 1093) con un tamiz de 0.5 mm, sonicador (Ultrasonic cleaner Sb 3200 DTN), balanza analítica OHAUS® Pioneer PA214, recirculador (SEV ECO10), rotavapor (Heidolph 2) con bomba de vacío (MD 4 NT), rotavapor (Buchi R-3) con bomba de vacío (Vacuum Pump V-700), lámpara de luz ultravioleta con longitudes de onda de 254 y 365 nm Spectroline, espectrómetro de RMN Avance III HD de 400 MHz Bruker, tubos para RMN de 5 mm, material de vidrio en general, columnas cromatográficas de vidrio de 60, 55 y 45 cm de longitud y 6, 2.5 y 2 cm de diámetro, respectivamente, espátulas, algodón, papel filtro Whatman,

cromatofolios 20 x 20 cm TLC de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck). Campana de bioseguridad A2 Logict, incubadora orbital INO-650.MR Prendo, incubadora Thermoscientific®, cuenta colonias, tubos para microcentrífuga, soporte con puntas para micropipetas de 10-1000 µL, micropipetas (TOPSCIEN), microscopio óptico (Zeigen), cámara de Neubauer (Sigma-Aldrich), agitador vortex IKA®, plato giratorio Clenceware®, autoclave ACH-22.

3.1.3 Material biológico para los bioensayos

Se utilizaron cepas de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas genéticamente: JN362a, JN394, proporcionadas por el Dr. John Nitiss del St. Jude Children's Reserch Hospital de Memphis, Tennessee, E. U. A.

3.1.4 Colecta del material vegetal

En septiembre del 2018 se realizó una colecta del material vegetal en el Jardín Botánico de Chepilme, distrito de Pochutla, Oaxaca, México, ubicado en las coordenadas 15°779'444" latitud N y -96°436'111" longitud O, a una altura de 120 m smn. Ejemplares de esta especie fueron identificados como *Acalypha cuspidata* Jacq. por la M. en C. Ernestina Cedillo Portugal de la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH). Los especímenes fueron depositados en el herbario Jorge Salas Espinoza de la UACH con número de *voucher* UACH 25068.

3.2 Obtención de extractos de *A. cuspidata*

3.2.1 Preparación de la muestra

El material vegetal (hojas-flores = **A**; tallos = **B** y raíces = **C**) se secó a temperatura ambiente sobre papel periódico y al resguardo de la luz. Posteriormente, para obtener partículas homogéneas y un área superficial mayor para la extracción con el disolvente, se procedió a moler las muestras (**A**, **B** y **C**, respectivamente) en un molino ciclónico con un tamiz de 0.5 mm, el polvo obtenido se guardó a 4 °C, Figura 12.



Figura 12. Proceso para obtener muestra de menor tamaño de partícula.

3.2.2 Obtención de fracciones de hojas-flores (A)

Herrera-Martínez (2016), reportó que los compuestos activos de *A. cuspidata* se encontraban en las fracciones de polaridad intermedia solubles en AcOEt. Con este antecedente, la obtención de fracciones solubles en AcOEt fue un objetivo clave para lograr un proceso de separación efectiva de dichos compuestos activos. La obtención de estas fracciones se describe a continuación.

Primeramente se obtuvo el extracto metanólico de hojas-flores (**A₁**). Para ello se colocaron 100 g de muestra (seca y molida) con 250 mL de MeOH y se sonicó en un baño ultrasonido por 15 min a 25 °C. El sobrenadante se decantó y filtró, el disolvente se removió en un rotavapor a 43 °C al vacío, Figura 13. El extracto obtenido (24.45 g) se guardó en refrigeración. Esta extracción se realizó siete veces y se calculó el rendimiento de extracción ($24.45 \pm 0.35 \%$).



Figura 13. Proceso para obtener el extracto MeOH de *A. cuspidata*.

En la Figura 14, se presenta un esquema de la metodología general empleada para la obtención de extractos, fracciones y compuestos puros de los órganos de *A. cuspidata*.

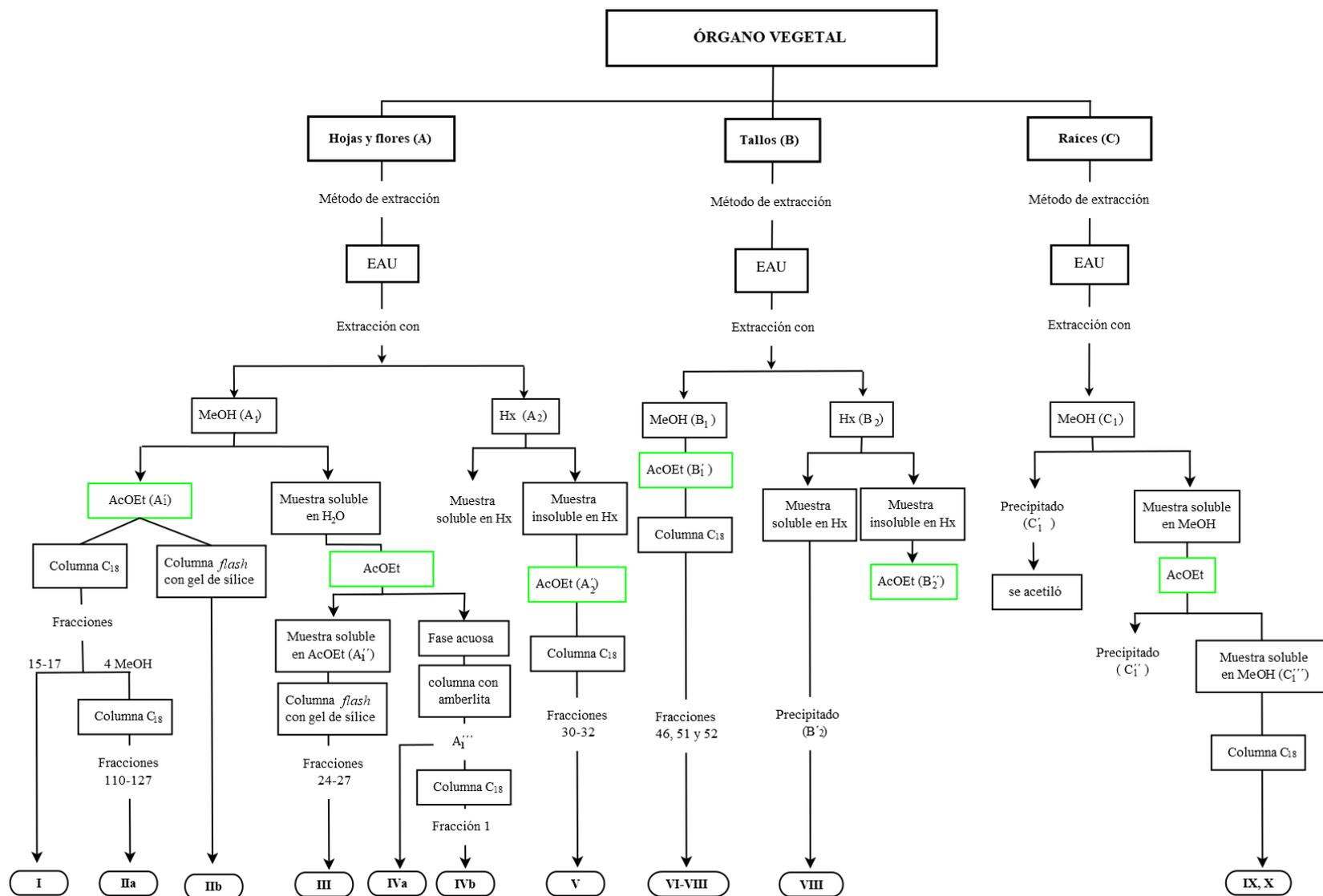


Figura 14. Metodología general empleada para la obtención de extractos y fracciones de *A. cuspidata*.

El extracto metanólico (**A₁**) se trató de dos maneras, Figura 14. La primera vía se siguió como lo reportó Herrera-Martínez (2016), brevemente, se pesaron 10 g de **A₁**, se suspendieron en 25 mL de AcOEt y se llevó a un baño de ultrasonido por 15 min a 25 °C. Pasado este tiempo, la fase orgánica se retiró por filtración, y se volvió a realizar la extracción cinco veces más. Las fases orgánicas de AcOEt se combinaron y se llevaron a sequedad a presión reducida, dando el extracto **A₁'** (1.22 ± 0.15 g; 12.20 %) Figura 14.

Las separaciones cromatográficas de **A₁'** se realizaron tanto en cromatografía reversa como en fase normal (en columna *flash*). Sin embargo, empleando esta metodología, el extracto **A₁'** presentó una gran cantidad de clorofilas que minimizó la resolución de las columnas cromatográficas, razón por lo que, se decidió realizar una precipitación de clorofilas en medio acuoso. Para ello, al extracto metanólico (**A₁**, 24.45 g) se le agregaron 250 mL de agua desionizada y filtrada y se colocó la suspensión en una parrilla eléctrica con agitación magnética por tres horas. Pasado este tiempo el sobrenadante se filtró por papel filtro Whatman No. 1, quedando una muestra libre de sólidos que se vertió en un embudo de separación. Posteriormente, se realizó una extracción líquido-líquido con AcOEt (350 mL x 3). La parte soluble en AcOEt se secó sobre Na₂SO₄, filtró y evaporó a presión reducida, obteniendo así el extracto **A₁''** (0.44 ± 0.25 g; 1.8 %). Mientras que la fracción acuosa se pasó por una columna con amberlita y se obtuvo el extracto **A₁'''** (1.5 ± 0.17 g; 6.13 %).

Otra manera de tratar el extracto **A₁** fue realizando extracciones sucesivas, empleando disolventes de polaridad creciente, comenzando con Hx, CH₂Cl₂, CHCl₃, AcOEt y por último MeOH. Del análisis de las señales del espectro de RMN-¹H de las fracciones obtenidas, se determinó realizar la extracción sólo con Hx (**A₂**) y posteriormente con AcOEt (más polar que CH₂Cl₂ y CHCl₃) obteniendo así al extracto **A₂'** (2.8 ± 0.35 g; 2.8 %), Figura 14.

3.2.3 Obtención de fracciones de los tallos (B)

Se realizó la extracción de los tallos secos y molidos con MeOH, tal como se describe en la sección 3.2.2. Posteriormente, al extracto metanólico (**B₁**) obtenido (7.04 ± 1.35 g, 7.04 %) se le realizaron extracciones con AcOEt (**B₁'**, 250 mL x 5) y se calculó el rendimiento (305.2 ± 0.98 mg, 4.33 %).

Otra forma de tratamiento que se le hizo a **B**, fue realizando extracciones sólido-líquido sucesivas, primeramente con Hx (**B₂**) (105 ± 0.9 mg, 0.10 %) luego con AcOEt (**B₂'**) (308.22 ± 0.12 mg, 0.30 %), después con MeOH (7.10 g, 7.10 %) y por último una extracción hidroalcohólica (100 mL de MeOH/H₂O, 1:1; 2.22 g, 2.2 %).

De la fracción soluble en Hx se formó un precipitado (**B₂'**), que se lavó con MeOH resultando un sólido blanco cristalino, el cual, al agregarle CHCl₃ y acetona cristalizó a temperatura ambiente.

3.2.4 Obtención de fracciones de raíces (C)

Se realizaron extracciones con MeOH (**C₁**) a las raíces de *A. cuspidata* por 15 min a 25 °C asistidas con ultrasonido y se llevó a sequedad total. Se obtuvieron 6.10 g (8.72 %) del crudo metanólico. Posteriormente a 3.10 g del extracto se le agregaron 20 mL de MeOH y se formó un precipitado (**C₁'**, 197 mg, 6.35 %), se separó de la disolución y debido a su insolubilidad para ser analizado por RMN-¹H, éste se acetiló. Al extracto crudo restante se le agregaron AcOEt (20 mL x 4) y se formó otro precipitado (**C₁''**). Por último quedó una muestra sin precipitados totalmente soluble en MeOH (**C₁'''**, 900 mg, 29.03 %).

Acetilación de **C₁'**:

Se metió a reflujo 70 mg de **C₁'** durante 24 horas, con 1 mL de piridina y 3 mL de anhídrido acético. Finalizado el tiempo de reacción, el exceso de anhídrido acético se hidrolizó con agua fría. Subsecuentemente, se realizaron dos extracciones con CH₂Cl₂ (40 mL x 2); las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con 20 mL de HCl (acuoso al 10 %) luego con agua fría (30 mL x 3). En seguida, se le agregaron 20 mL de NaHCO₃ (disolución saturada) y se lavó con agua añadiéndole NaCl (para evitar emulsión) hasta obtener un pH cercano a 7. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, filtró y evaporó. Se obtuvieron 20.0 mg de **C₁'** acetilado (28.57 %) soluble en piridina, que se analizó por RMN-¹H.

3.3 Separación y purificación de compuestos

A continuación, se describen las separaciones en columnas cromatográficas que se efectuaron en hojas-flores (**A**), tallos (**B**) y raíces (**C**).

3.3.1 Cromatografía del extracto A₁'

El extracto A₁' se cromatografió en una columna de fase reversa con mezcla de acetonitrilo (ACN)/H₂O. En las fracciones etiquetadas como "15-17" (9:1, H₂O/ACN) se formó un polvo de color amarillo-anaranjado, soluble en DMSO, cuya cromatografía en capa fina (1:1, MeOH/H₂O) mostró un componente principal. Por consiguiente, esta fracción se lavó con MeOH quedando un polvo totalmente amarillento (4.3 mg, etiquetado como **I**) que se analizó por RMN en una y dos dimensiones.

Cromatografía de "4 MeOH" proveniente del extracto A₁'

La fracción etiquetada como "4 MeOH" (una de las últimas fracciones obtenidas del extracto A₁') al ser monitoreada por CCF en gel de sílice (7:3, Hx/AcOEt) se observó solo un componente que eluyó, por esta razón, se realizó una extracción con Hx. Esta fracción hexánica, se sometió a una segunda columna de fase reversa. Brevemente, se utilizó una columna de vidrio de 45 cm de alto y dos cm de diámetro, en un vaso de precipitado se mezcló aproximadamente 10 g de C₁₈ en 15 mL MeOH y se vertió en la columna alcanzando una altura de 12 cm y se procedió a acondicionarla eluyendo todo el MeOH con 50 mL de cada una de las mezclas siguientes, 75:25 (MeOH/H₂O), 50:50 (MeOH/H₂O), 25:75 (MeOH/H₂O) hasta 100 % H₂O. Posteriormente se adicionaron a la columna 462.4 mg de la fracción hexánica soportada en C₁₈. Se eluyó con 50 mL de cada una de las mezclas siguientes de H₂O/MeOH (100:0) hasta llegar al 100 % de MeOH. Las fracciones de aproximadamente 10 mL fueron monitoreadas por CCF de fase reversa utilizando luz UV de longitudes de onda de 254 y 365 nm y las que presentaron el mismo perfil cromatográfico se combinaron. De esta columna se obtuvieron 143 fracciones. Las fracciones etiquetadas como "110-127" (100.3 mg) presentaron el compuesto mayoritario con algunas impurezas. Para su subsecuente purificación, se aplicaron 15 mg de dicha fracción a lo largo de placas de 5 x 3 cm de fase reversa en un sistema 1:9 H₂O/ACN, por último se realizaron extracciones con MeOH de las bandas del compuesto principal. Este procedimiento permitió asignar la estructura química del compuesto principal (5.5 mg, 1.19 %) y fue etiquetado como **IIa**.

Después de separar los componentes de A₁' mediante cromatografía de fase reversa, la separación se continuó con cromatografía de fase normal en columna *flash*, brevemente:

la columna de vidrio de 60 x 2.5 cm con algodón en el fondo se relleno con gel de sílice (230-400 mallas) a una altura de 30 cm. Inicialmente la columna se eluyó con Hx y su recorrido en el interior de la columna fue acelerado por una presión de aire regulada con una llave de flujo, para la eliminación de burbujas de aire en el gel de sílice.

Con la columna acondicionada, se procedió a colocar la muestra (400 mg, solubilizada en AcOEt) y se eluyó con Hx, mezclas de Hx/AcOEt, AcOEt, AcOEt/MeOH y MeOH. Los eluatos colectados en viales de vidrio de 25 mL se monitorearon en cromatofolios de sílice con luz UV de longitudes de onda de 254 y 365 nm. Las fracciones con el mismo perfil cromatográfico se agruparon, por lo que se obtuvieron 26 fracciones. La fracción marcada como fr2 (4.5 mg, 1.13 %) fue etiquetada como **IIIb**, y se analizó por RMN-¹H.

3.3.2 Cromatografía del extracto A₁''

Se eluyeron dos columnas *flash* para este extracto. La primera fue tal cual el extracto A₁'', mientras que la segundo, el extracto A₁'' se trató con carbón activado. Se empleó una columna de vidrio de 45 cm de alto y cinco cm de diámetro, se colocó algodón en el fondo para evitar la salida del gel de sílice. Posteriormente en un vaso de precipitado se mezcló aproximadamente 50 g de gel de sílice (230-400 mallas) con Hx, y se vertieron a la columna con presión de aire. Luego se adicionaron a la columna 922.5 mg del extracto A₁'' disuelto en la mínima cantidad de acetona (1.5 mL aprox.). Se eluyó el extracto A₁'' con disolventes de polaridad creciente; empezando con Hx, mezclas de Hx/AcOEt, AcOEt, AcOEt/MeOH y finalizando con MeOH. Se colectaron fracciones de aprox. 25 mL c/u, que al ser monitoreadas por CCF de fase normal (4 mL de Hx: AcOEt: MeOH; 1: 3: 6, más una gota de ácido fórmico) utilizando luz UV, de longitudes de onda de 254 y 365 nm. En la primera fracción obtenida con puro Hx se logró definir un componente (se obtuvieron un total de 26 fracciones).

Debido a una alta coloración amarilla oscura, el extracto A₁'' se solubilizó en MeOH y añadió carbón activado en relación 1:1, se calentó por cinco minutos y se filtró con papel Whatman, el filtrado se llevó a sequedad obteniendo un extracto con una tonalidad amarilla más clara. Posteriormente este extracto se eluyó en una columna *flash*, de 60 cm de alto por 2.5 cm de diámetro con una altura de 30 cm con gel de sílice. Se

acondicionaron 400.1 mg de **A₁''** y eluyó tal como se describió la columna anterior, se obtuvieron 43 fracciones. Las fracciones 24-27 (etiquetada como **III**), se combinaron y analizaron RMN-¹H.

3.3.3 Cromatografía de **A₁'''**

La fase acuosa proveniente de la extracción líquida-líquida con AcOEt (**A₁''**), Figura 14, se cromatografió en una columna empacada con amberlita a una altura de 25 cm, con la finalidad de eliminar los azúcares libres. Primeramente, la columna se acondicionó con MeOH por cuatro horas, y subsecuentemente con 400 mL de agua desionizada, filtrada y desgasificada. Posteriormente, la muestra se colocó en la columna y se eluyó inicialmente con 500 mL de H₂O a un flujo de 1 gota por minuto aproximadamente, y por último con MeOH (1 L), este procedimiento tomó más de una semana. Se obtuvieron tres fracciones metanólicas cada una con 330 mL aproximadamente. En la fracción dos, precipitó un polvo color pardo, se solubilizó en DMSO-*d*₆ y se obtuvieron los datos de RMN, indicando que la muestra todavía no tenía la pureza suficiente para asignar estructura química. Posteriormente se regresó al vial original y se cubrió de la luz a temperatura ambiente, y luego se observó que se formó nuevamente un precipitado (polvo, etiquetado como **IVa**), el sobrenadante se analizó por RMN. Por último se combinaron las tres fracciones obtenidas (**A₁'''**) para purificarlas en fase reversa.

Posteriormente **A₁'''**, con un peso de 1.200 g, se cromatografió en una columna de vidrio de 45 cm de alto y 2.5 cm de diámetro empacada con C₁₈ (13 cm de alto). Se acondicionó tal como se describe en la sección 3.3.2, empleando como fase móvil una mezcla de H₂O/MeOH con gradiente de polaridad. Se colectaron 112 fracciones de 25 mL c/u aproximadamente, al ser monitoreadas por CCF de fase reversa sólo la fracción uno (5.3 mg, etiquetada como **IVb**) obtenida con H₂O se resolvió (1:1, H₂O/MeOH), observándose un solo componente con algunas impurezas, por lo que se analizó mediante RMN uni y bidimensional.

3.3.4 Cromatografía de **A₂'**

El extracto **A₂'**, se eluyó en una columna de vidrio de 30 cm de alto y 6 cm de diámetro empleando C₁₈. Brevemente, en un vaso de precipitado de 500 mL se mezclaron 80 g de

C₁₈ con 300 mL de MeOH y se vertió alcanzando una altura 12 cm y se procedió a acondicionarla tal como se describe en la sección 3.3.1. Posteriormente se adicionaron a la columna 4.09 g de **A2'** soportada en C₁₈. Se eluyó con una mezcla de H₂O/MeOH (100:0) hasta llegar al 100 % de MeOH. Las fracciones de aproximadamente 20 mL fueron monitoreadas por CCF de fase reversa utilizando luz UV de longitudes de onda de 254 y 365 nm y las que presentaron el mismo perfil cromatográfico se combinaron. De esta columna se obtuvieron 77 fracciones. En las fracciones "30-32" (90:10, MeOH/H₂O) precipitó un polvo blanco soluble en piridina (etiquetado como **V**), y fue analizado por RMN.

3.3.5 Cromatografía **B1'**

El extracto **B1'** se cromatografió en una columna de vidrio de 45 cm de alto y dos cm de diámetro empacada con C₁₈ (12 cm de alto). Se acondicionó de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 3.3.2. Posteriormente se adicionaron a la columna 600.1 mg de **B1'** soportada en C₁₈ y se eluyó inicialmente con H₂O, luego, con mezclas de H₂O/MeOH y por último, con MeOH. Se colectaron fracciones de 25 mL, y se monitorearon por CCF de fase reversa utilizando luz con longitudes de onda de 254 y 365 nm, obteniendo un total de 78 fracciones. Las fracciones 45, 51 y 52 se etiquetaron como **VI**, **VII** y **VIII**, respectivamente.

3.3.6 CC de fase reversa del extracto **C1'''**

La purificación de **C1'''** (900 mg) se realizó en una columna de vidrio misma que se ocupó para separar **B1'**, se acondicionó y eluyó de la misma manera, sección 3.3.6. Se colectaron fracciones de 50 mL aproximadamente, se monitorearon por CCF de fase reversa usando luz UV de longitudes de onda de 254 y 365 nm. Se obtuvieron 64 fracciones. Sólo la 37 (etiquetada como **IX**, 2 mg) y 39 (etiquetada como **X**, 17.5 mg) se analizaron mediante RMN.

3.4 Elucidación de estructuras químicas

La elucidación estructural de los compuestos obtenidos se efectuó mediante la interpretación de los espectros generados por Resonancia Magnética Nuclear unidimensional y bidimensional.

3.4.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los experimentos de RMN-¹H fueron obtenidos a 400.17 MHz con una ventana espectral de 0-16 ppm, de 16 a 64 escaneos y el programa de pulsos zg30, y para ¹³C-RMN a 100.62 MHz, con una ventana espectral de 0-230 ppm, de 4000 a 153600 escaneos y el programa de pulso zgpg30. Los experimentos de 2D fueron gHMBC, 256 a 1024 escaneos con el programa de pulso hmbcgpplndqf, gHSQC, 64 a 256 escaneos con el programa de pulsos hmbcgpplndqt, gCOSY, 64 escaneos con el programa de pulso cosygpppqf y DEPTQ 7000 a 11919 escaneos con el programa de pulso deptqgppsp. La temperatura de la sonda fue de 298.1 K. En los espectros bidimensionales heteronucleares F1 correspondió al ¹³C y F2 al ¹H. Las fracciones a analizar fueron disueltas en 0.5 mL de disolvente deuterado con la polaridad apropiada (en el Cuadro 4, se muestran los desplazamientos químicos y multiplicidad de los disolventes deuterados empleados) posteriormente, se colocaron en tubos de vidrio de 5 mm de diámetro y fueron introducidos al equipo de RMN.

Cuadro 4. Desplazamientos químicos (ppm) y multiplicidades en RMN-¹H y ¹³C de disolvente deuterados empleados en este trabajo de investigación.

Disolvente	δ_H (multiplicidad)	δ_H HOD	δ_C (multiplicidad)
Cloroformo- <i>d</i>	7.26 (simple)	1.5	77.0 (triple)
DMSO- <i>d</i> ₆	2.49 (señal quintuple)	3.3	39.7 (señal séptuple)
Metanol- <i>d</i> ₄	4.78 (simple) 3.30 (señal quintuple)	5.0	49.0 (señal séptuple)
Piridina- <i>d</i> ₅	8.74 (simple) 7.58 (simple) 7.22 (simple)	5.0	123.5 (triple C-3, 5) 135.5 (triple C-4) 149.2 (triple C-2, 6)

3.5 Actividad antitopoisomerasa

3.5.1 Preparación de los tratamientos y controles

La actividad antitopoisomerasa se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Jensen *et al.* (2000) con las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* antes mencionadas (sección 3.1.3). Se empleó DMSO como control negativo, mientras que como controles positivos a la CPT (50 µg/mL) y ETP (100 µg/mL). La concentración de los compuestos a evaluar se determinó de acuerdo a lo descrito por Cos *et al.* (2006), los compuestos puros a 20 mM/mL y compuesto en mezcla a 12.5 mg/mL disueltos en DMSO. En seguida se describe la metodología empleada para evaluar la actividad antitopoisomerasa.

3.5.2 Activación de cepas

Para la activación de las cepas JN394 y JN362a, se utilizó extracto de Levadura-Peptonadextrosa Caldo (YPDB, preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante), se tomaron 5 mL del medio y se vertieron en matraces Corning, en seguida se inoculó cada matraz con su respectiva cepa y se incubó a 30 °C con 150 r.p.m durante un tiempo de 12-14 horas.

3.5.3 Cuento de células para el ajuste de 2×10^6 células/mL

Trascurrido el tiempo de incubación (sección 3.5.2), 100 µL de cada cepa se vertieron en tubos para microcentrífuga y, se le adicionaron 900 µL de disolución salina al 0.85 %. Se realizaron tres diluciones más; tomando un volumen de 500 µL de la primera dilución y se ajustó a 1 mL con la adición de disolución salina (500 µL), para la tercera dilución se tomaron 500 µL de la segunda dilución más 500 µL de azul de tripano (el núcleo de las células muertas se tiñe color azul) y por último, se tomaron 200 µL de la tercera dilución y 800 µL de la disolución salina. Por lo que, el factor de dilución fue: $10 \times 2 \times 2 \times 5 = 200$. A partir de la última dilución se midieron 10 µL los cuales cuidadosamente se vertieron en la cámara de Neubauer para la contabilización de células viables bajo el microscopio óptico. Con el resultado obtenido (células/mL) se procedió a ajustar a una concentración de 2×10^6 células/mL.

3.5.4 Aplicación de controles y tratamientos

En condiciones de esterilidad se procedió a colocar en cada matraz un volumen de 3 mL de medio YPDB con 6×10^6 células/mL, posteriormente, se adicionaron 50 μ L de cada tratamiento y control (sección 3.5.1). Los matraces fueron colocados en una incubadora a 30 °C a 150 rpm durante 24 horas, Figura 15.



Figura 15. Incubación de las cepas con sus respectivos tratamientos y controles.

3.5.5 Dilución y determinación de células viables

Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el efecto que tuvo cada tratamiento, para ello: se midieron 100 μ L del cultivo celular y se colocaron en tubos para microcentrífuga estériles, se adicionaron 900 μ L de agua estéril y se continuó con diluciones en serie hasta obtener cinco diluciones decimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Solo se trabajó con la dilución de 10^{-5} , se midieron 100 μ L de esta última dilución y se sembraron por triplicado en placas con medio extracto de Levadura-Peptona-Dextrosa Agar (YPDA, agar al 1.75 %) Figura 16, en seguida se incubaron a 30 °C por 48 horas.

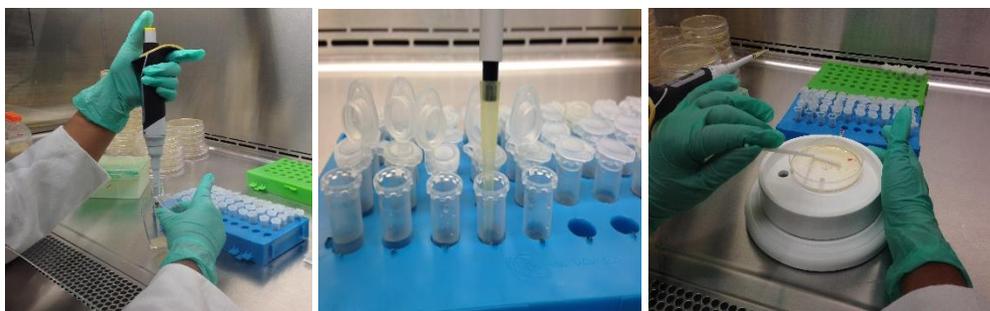


Figura 16. Dilución y sembrado de las cepas después de haber aplicado los tratamientos.

Terminado el tiempo de incubación se determinó la actividad antitopoisomerasa: se efectuó el conteo de las UFC de cada cepa por cada tratamiento Figura 17, y se calculó el porcentaje de crecimiento empleando la Fórmula 2, comparando el número de colonias contadas en cada placa con las obtenidas en DMSO (control negativo).

$$\text{Fórmula 2: \% de crecimiento} = \frac{\text{UFC (del tratamiento)} \times 100}{\text{UFC (del control negativo)}}$$

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la Fórmula 3.

$$\text{Fórmula 3: \% de inhibición} = 100 - \% \text{ de crecimiento}$$

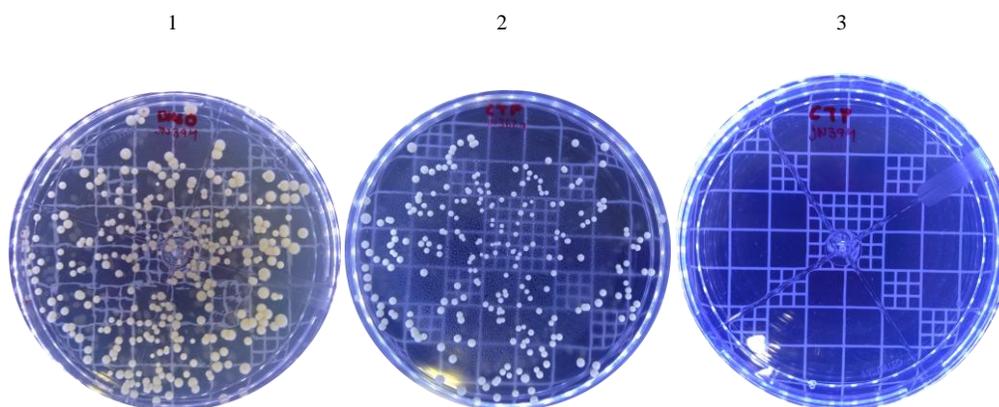


Figura 17. Conteo de las UFC. 1) Crecimiento de la cepa JN394 con control negativo (DMSO). 2) Crecimiento de la cepa JN362a con el control positivo (CPT) y 3) Crecimiento de la cepa JN394 con CPT.

3.6 Análisis estadístico

El experimento de la prueba biológica se realizó por duplicado, por lo que los datos obtenidos fueron la media \pm desviación estándar de dos valores. Los porcentajes de crecimiento y/o inhibición se compararon con un análisis de varianza (ANOVA) seguido de un procedimiento de comparación múltiple de medias (prueba de Tukey) para cada cepa, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, usando el programa Statistica versión 10.

Capítulo 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección, se presentan los resultados con sus respectivas discusiones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico de las hojas-flores (**A**), tallos (**B**) y raíces (**C**) de *A. cuspidata*, así como, la evaluación de la actividad antitopoisomerasa de compuestos puros y en mezclas.

4.1 Muestras y obtención de extractos de *A. cuspidata*

El Cuadro 5, resume los rendimientos de las distintas muestras abordadas en este trabajo. Al realizar la comparación de los rendimientos considerando el órgano vegetal de *A. cuspidata*, se tiene que, el rendimiento del extracto metanólico en **A**, **B** y **C** fue de 24.45 ± 0.35 ; 7.04 ± 1.35 y 8.72 %, respectivamente. La diferencia que se observó entre estos extractos, puede atribuirse a que algunos compuestos están restringidos específicamente y en mayor cantidad en ciertos órganos. Por ejemplo, el rendimiento alto en **A** (hojas-flores) se debió a la presencia de clorofilas en mayor cantidad. **B**, presentó más compuestos de naturaleza no polar como esteroides y ácidos grasos, y en **C**, predominaron compuestos polares.

Cuadro 5. Rendimiento de extractos crudos en los diversos órganos de *A. cuspidata*.

Órgano vegetal	Extracto	Descripción	Rendimiento (%)
Hojas-flores	A₁	crudo metanólico	24.45 ± 0.35
	A₁'	con clorofilas	12.20 ± 0.15
	A₁''	sin clorofilas	1.8 ± 0.45
	A₁'''	fracción acuosa insoluble en AcOEt	6.13 ± 0.17
Tallos	A₂'	desengrasado	2.8 ± 0.35
	B₁	crudo metanólico	7.04 ± 1.35
	B₁'	extracto de AcOEt del crudo MeOH	4.33 ± 0.98
Raíces	B₂''	desengrasado	0.30 ± 0.12
	C₁	crudo metanólico	8.72

Un análisis comparativo en el rendimiento de **A** con el descrito por Herrera (2010) y Lira-De León *et al.* (2017) (8.55 y 3.1 %, respectivamente), reveló que la metodología asistida por ultrasonido presentó un mejor rendimiento. Esto es debido a que, en la extracción asistida por ultrasonido, la tensión mecánica induce cavitaciones y degradación celular mejorando la salida de los metabolitos secundarios del medio celular (Bucar *et al.*, 2013) en comparación con el método tradicional de maceración a temperatura ambiente.

4.2 Interpretación de los datos espectroscópicos de RMN

4.2.1 Espectroscopía de RMN-¹H de las fracciones de hojas-flores (A)

En la Figura 18, se muestran los espectros de RMN-¹H de los extractos de **A**, provenientes de hojas y flores tal como se describió en la sección 3.2.2. El espectro del trazo inferior corresponde al extracto **A1''**, donde se confirmó la remoción de clorofilas al no observarse señales en la región δ_H 7.95-9.51 pertenecientes al anillo porfirínico presente en las clorofilas (Abraham y Rowan, 1991), a diferencia de los otros tres espectros donde adicionalmente se observaron señales de protones de hidrocarburos saturados e insaturados en δ_H 0.7-2.2, así, como de protones alílicos δ_H 1.6-2.2 y vinílicos δ_H 4.5-6.5. En general los espectros restantes de la Figura 18, son muy similares, ya que se observaron las mismas señales a frecuencias altas, sin embargo, el extracto **A2'** presentó menos señales que integraron para un número menor de protones a frecuencias bajas, δ_H 0.3-1.5 perteneciente a la región lipídica. Se infirió que esto se debió al hecho de haber retirado los componentes solubles en Hx de este extracto, en consecuencia, se retiró un alto contenido de compuestos no polares.

Por otra parte, debido a la posible inestabilidad de los compuestos presentes en los extractos durante el proceso de extracción se decidió hacerlo mediante maceración y se realizó la comparación con el espectro de RMN-¹H obtenido por ultrasonido, Figura 18, ambos espectros presentaron las mismas señales, de modo que el método de extracción no afectó a los compuestos, pero sí el rendimiento en peso y los tiempos de extracción.

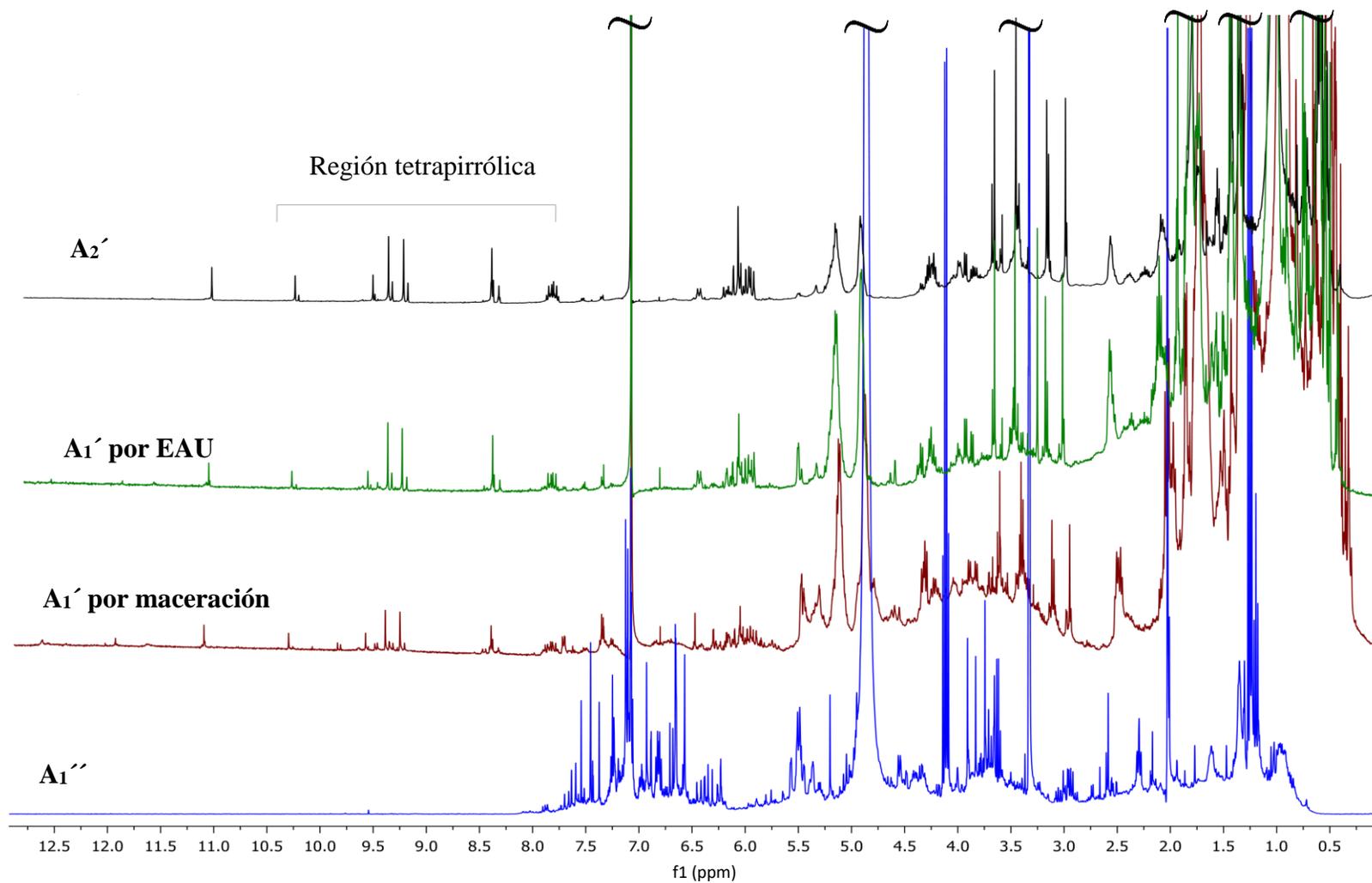


Figura 18. Espectro de RMN- ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de los distintos extractos de hojas-flores de *A. cuspidata*. El gráfico A₁'' se obtuvo por extracción líquido-líquido de la fracción acuosa. Los espectros de en medio (A₁') provinieron del crudo metanólico, se obtuvieron por maceración y EAU. El espectro A₂', se obtuvo de extracciones sucesivas con Hx y AcOEt. El símbolo virgulilla hace referencia a que hubo un corte en la parte superior del espectro.

4.2.2 Espectroscopía de RMN-¹H de las fracciones de tallos (B)

Debido, a que en los espectros de los extractos solubles en AcOEt (sección 4.2.1) provenientes de hojas-flores (A) las señales de los compuestos de interés se observaron con una intensidad baja predominando las señales características de las clorofilas, se optó por evaluar extractos de los tallos (B).

El espectro de RMN-¹H en CDCl₃ (Figura 19, trazo inferior), reveló a B, libre de clorofilas (región δ_H 7.95-9.51) y a frecuencias bajas (δ_H 1.6-0.3) se evidenció una disminución de señales correspondientes a compuestos no polares. Además, se comparó con los espectros de dos fracciones, Figura 19 (trazo medio y superior), obtenidas por Herrera-Martínez (2016) y capaces de inhibir la proliferación celular de SKOV-3 (IC₅₀ de 27.78 $\mu\text{g/mL}$). De la figura 19, se observó que los espectros presentaron los mismos tipos de señales, con diferencias sólo en la intensidad. Por lo anterior, se infirió que los compuestos de interés están presentes en mayor cantidad en tallos, que en las fracciones obtenidas de hojas-flores (A).

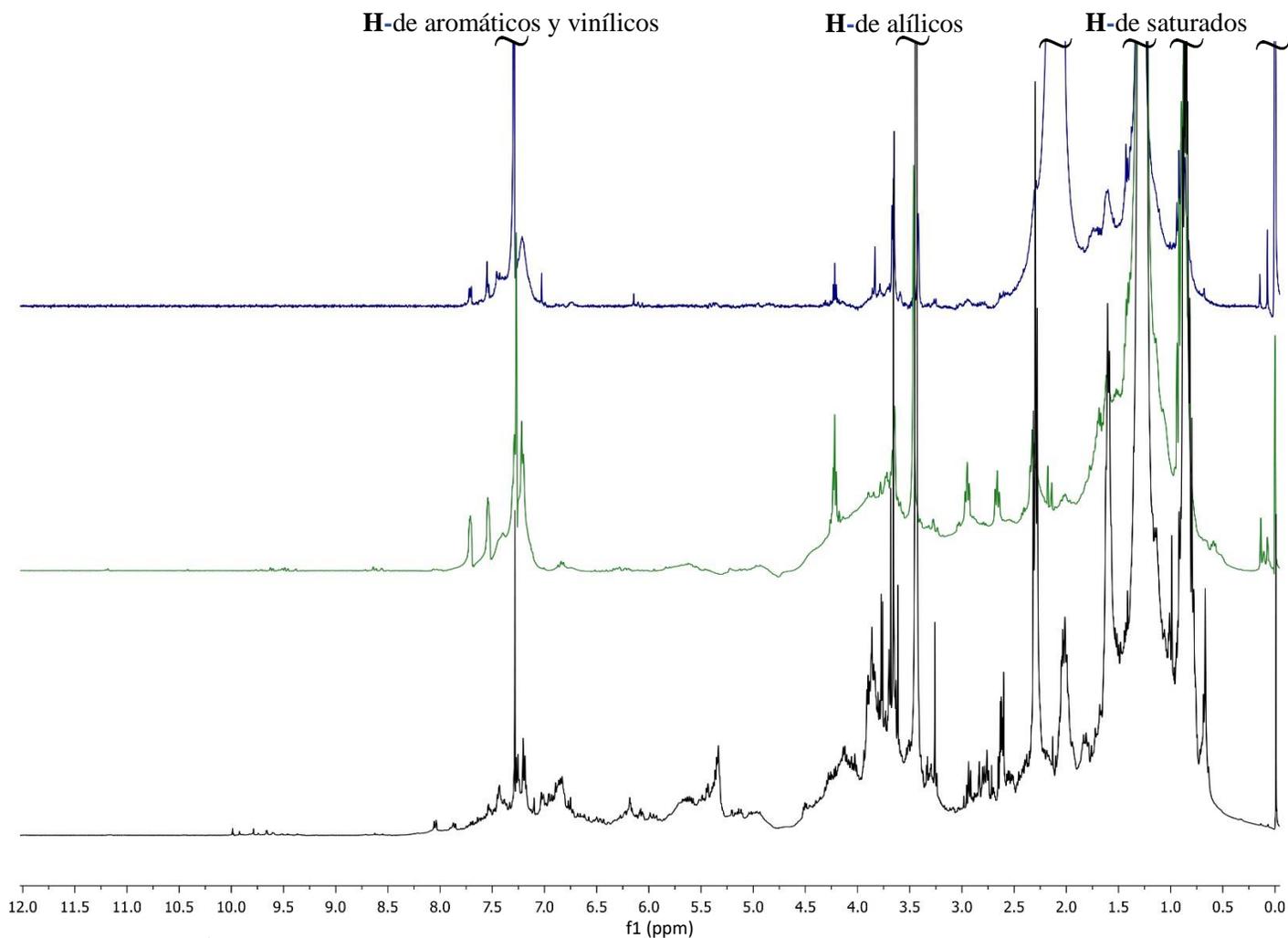


Figura 19. Espectros de RMN- ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de las fracciones aisladas de tallos (**B**) de *A. cuspidata* (trazo inferior), los trazos medio y superior corresponden a fracciones biológicamente activas obtenidas por Herrera-Martínez (2016). El símbolo virgulilla hace referencia a que hubo un corte en la parte superior del espectro.

4.2.3 Espectroscopía de RMN-¹H de las fracciones aisladas de raíz (C)

En la Figura 20, se muestra el espectro de RMN-¹H del precipitado que se formó al agregarle AcOEt al crudo metanólico, proveniente de raíz de *A. cuspidata*. A frecuencias altas en δ_H 7.37 se observó una señal doble (d, $J = 4.0$ Hz) de protón aromático. También hubo señales de carbohidratos, por lo tanto, se determinó el número de azúcares y sus configuraciones anoméricas: se observaron tres protones anoméricos en δ_H 5.17 (d, $J = 3.6$ Hz); δ_H 4.90 (d, $J = 4.0$ Hz) y δ_H 4.24 (d, $J = 7.6$ Hz). Por sus desplazamientos químicos y con el valor de las constantes de acoplamiento, se propuso que las señales etiquetadas como * y ** en la Figura 20, tienen configuración β , mientras que *** posee configuración α .

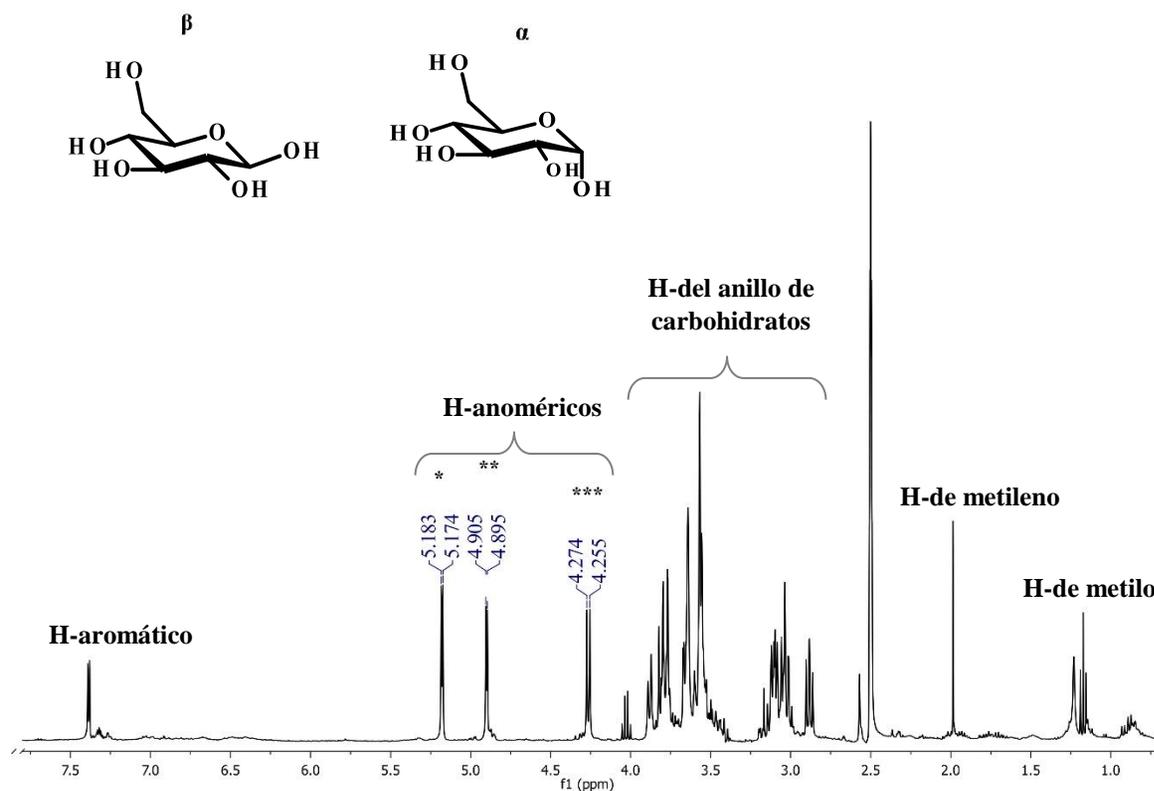


Figura 20. Espectro de RMN-¹H en D₂O a 400 MHz de la fracción soluble en agua proveniente del crudo MeOH de raíz de *A. cuspidata*.

Por otra parte, la Figura 21, corresponde al espectro de RMN- ^1H de la fracción metanólica libre de sólidos. En el intervalo de δ_{H} 6.8-7.7, se detectaron señales correspondientes a sistemas aromáticos, en tanto que, las señales ubicadas entre δ_{H} 3.0-4.5 se atribuyeron a protones base de hidroxilos de carbohidratos.

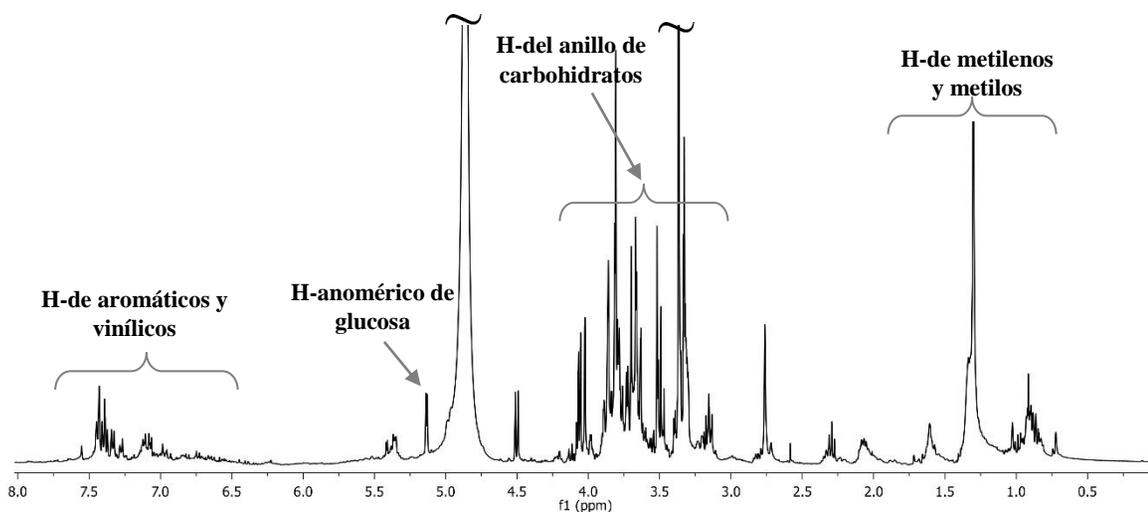


Figura 21. Espectro de RMN- ^1H en MeOD a 400 MHz de la fracción proveniente del crudo MeOH de raíz *A. cuspidata*. El símbolo virgullita hace referencia a que hubo un corte en la parte superior del espectro.

4.2.4 Elucidación estructural de I

El compuesto **I**, soluble en DMSO- d_6 , se analizó por RMN de ^1H y ^{13}C en una y dos dimensiones (COSY, HMBC y HSQC) y se identificó como metil carboxilato de brevifolina, Figura 22. En el espectro de RMN- ^1H se observaron un total de cinco señales: la señal simple ubicada en δ_{H} 7.30, es característica de un protón aromático y se asignó a H_7 . Se observó un sistema ABX, a frecuencias bajas se identificaron un par de señales doble de dobles en δ_{H} 2.46 ($J = 18.8, 2.0$ Hz) y δ_{H} 2.97 ($J = 18.8, 7.6$ Hz) que fueron asignadas a los protones diastereotópicos $\text{H}_{9\text{B}}$ y $\text{H}_{9\text{A}}$, respectivamente, y a través de sus constantes de acoplamiento, se estableció un acoplamiento geminal entre estos dos protones.

La señal doble de dobles ubicada en δ_H 4.42 se asignó al protón de metino H_{8x} que por sus constantes de acoplamiento de $J = 8.0, 2.0$ Hz, se estableció un acoplamiento vecinal con los protones H_{9B} y H_{9A} . Por otro lado, la señal simple situada en δ_H 3.62 es característica de un grupo metoxilo y se asignó a H_{12} . Así mismo, en la inspección del espectro de RMN- ^{13}C se observaron 14 carbonos, Cuadro 6. Tres carbonos de carbonilos situados en δ_C 160.0, 172.4 y 193.0 asignados a C_1 , C_{11} , y C_{10} , respectivamente. Las señales en δ_C 172.4 (C_{11}) y 52.0 (C_{12}) en conjunto con la señal de protón en δ_H 3.62 (H_{12}) corroboraron la presencia del grupo éster que se encuentra adyacente al C_8 , tal como se verificó en el experimento HMBC (Figura 23).

El resto de las señales fueron asignadas con la ayuda del experimento HMBC y comparadas con las descritas (Camacho-Luis *et al.*, 2008). En el Cuadro 6, se muestran todos los desplazamientos químicos de RMN de 1H y ^{13}C en $DMSO-d_6$ del compuesto **I**.

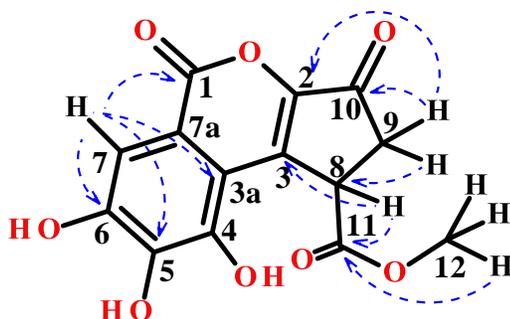


Figura 22. Estructura química de metil carboxilato de brevifolina (**I**) con las correlaciones observadas en el experimento HMBC, indicadas con flechas discontinuas.

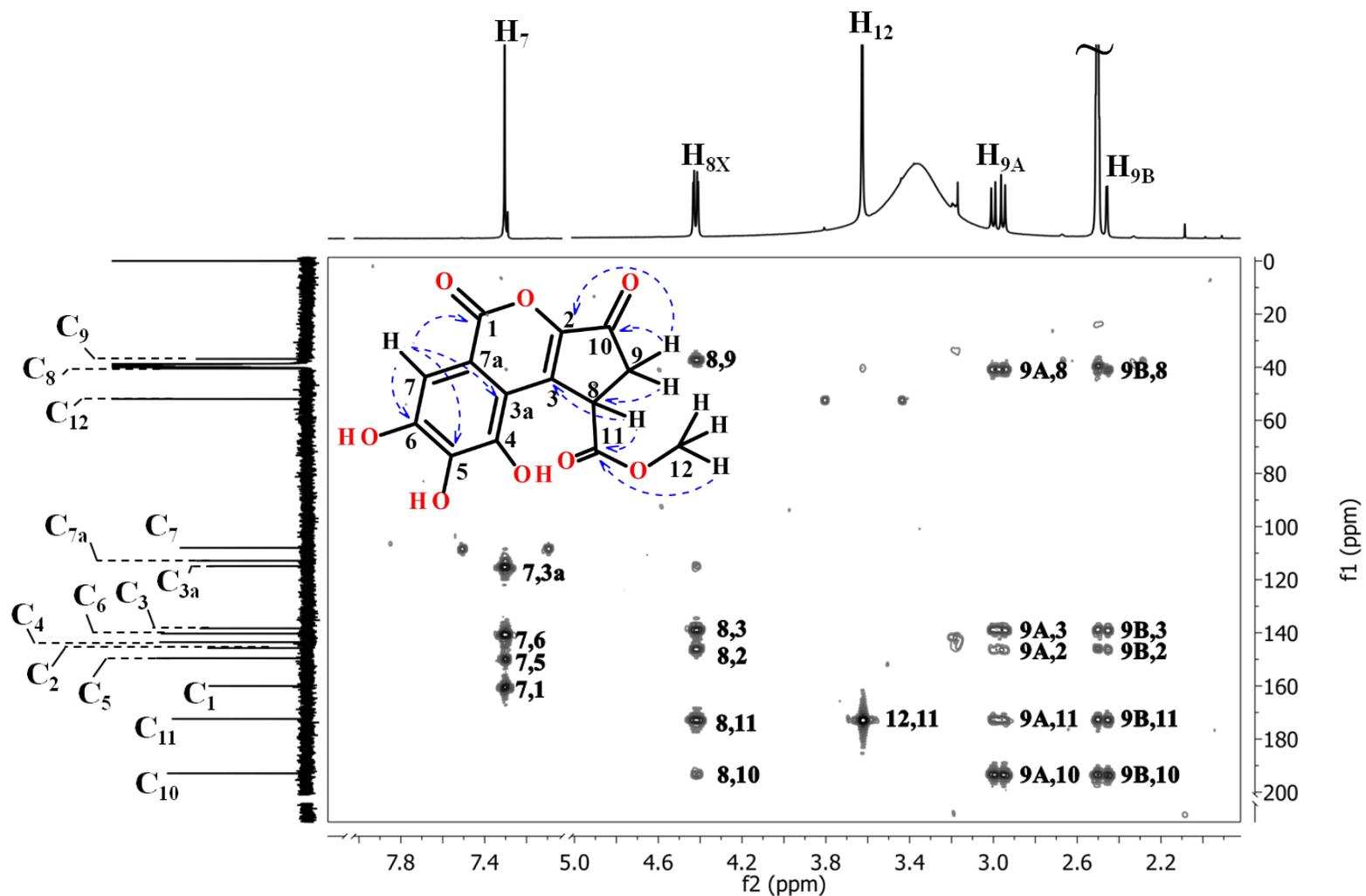


Figura 23. Espectro HMBC en DMSO- d_6 a 400 MHz de metil carboxilato de brevifolina (I). El símbolo virgullilla hace referencia a que hubo un corte en la parte superior del espectro.

Cuadro 6. Datos espectroscópicos de RMN-¹H [δ en ppm, multiplicidad, (J en Hz)] y ¹³C (400 y 100 MHz, respectivamente) de metil carboxilato de brevifolina (**I**) en DMSO-*d*₆.

Posición	δ_C	δ_H	HSQC	HMBC _{H-C}	COSY
1	160.0	-	-	-	-
2	145.7	-	-	-	-
3	138.3	-	-	-	-
3a	115.0	-	-	-	-
4	143.5	-	-	-	-
5	149.6	-	-	-	-
6	140.3	-	-	-	-
7	108.0	7.30, s	108.0	115.0, 140.3, 149.6, 160.0	-
7a	112.9	--	-	-	-
8 _x	40.5	X: 4.42, dd, ($J = 8.0, 2.0$)	40.5	36.9, 138.3, 145.7, 172.4, 193.0	H _{9B} , H _{9A}
9	36.9	A: 2.97, dd, ($J = 18.8, 7.6$) B: 2.46, dd, ($J = 18.8, 2.0$)	36.0	40.5, 138.3, 145.7, 172.4, 193.0	H _{9B} , H _{8X} H _{9A} , H _{8X}
10	193.0	-	-	-	-
11	172.4	-	-	-	-
12	52.0	3.62, s	52.0	172.4	-

Multiplicidad: s = simple, d = doble, dd = doble de dobles, ABX = sistema ABX.

El compuesto **I**, ha sido reportado en el género *Acalypha* (Marrez *et al.*, 2017; Amakura *et al.*, 1999) pero no en *A. cuspidata*.

Por otra parte, Peng *et al.* (2008) reportaron que la fracción fenólica de *Duchesnea indica* inhibe significativamente la proliferación celular de cáncer de ovario SKOV-3 (IC₅₀ = 80.68 ± 3.41 µg/mL) mediante el daño a mitocondrias. Posteriormente, Zhu y Guo (2015) identificaron los compuestos fenólicos en el extracto de dicha especie, y reportan la presencia de **I**. Por su parte Herrera-Martínez (2016) demostró el efecto que tuvo una fracción de AcOEt de *A. cuspidata* sobre células de cáncer de ovario SKOV-3, IC₅₀ = 86.5 µg/mL, es mediante el mismo mecanismo que reporta Peng *et al.* (2008), por lo anterior es probable que el compuesto **I**, sea uno de los compuestos responsable de esta actividad reportada.

4.2.5 Elucidación estructural de **IIa** y **IIb**

Después de que la primera columna de C₁₈ permitiera resolver las fracciones más polares provenientes **A1'**, las fracciones menos polares necesitaron otra separación para obtener muestras con la pureza necesaria (3.3.1), y se obtuvo a **IIa**.

A través del análisis de sus desplazamientos químicos del espectro de RMN-¹H (400 MHz en CDCl₃) Figura 24, se asignaron señales características de lípidos en δ_H 0.89 y 0.98 que corresponden a metilos terminales. En δ_H 1.28, se observó una señal ancha que pertenece a protones metilénicos (CH₂)_n típica de una cadena alifática en un ácido graso. Las insaturaciones se confirmaron por la señal múltiple en δ_H 5.54 que corresponde a protones vinílicos, así mismo, en δ_H 2.05 se observó una señal múltiple de protones alílicos, mientras que en δ_H 2.76 ($J = 6.2$ Hz) se observó una señal triple, asignable a protones doblemente alílicos (=HC-CH₂-CH=) (Guillén y Ruiz, 2003).

También se observaron dos señales triples en δ_H 1.59 y 2.26 ($J = 6.2, 7.4$ Hz) respectivamente, correspondientes a los protones adyacentes al carbonilo del éster en las posiciones β y α respectivamente. La presencia del carbonilo del éster se confirmó con la señal en δ_C 177.7 de RMN-¹³C, Figura 25. Adicionalmente, se identificó la presencia de un éster metílico de ácido graso, que se sustentó por la señal simple de ¹H en δ_H 3.64 y la de ¹³C δ_C 51.9 indicando la presencia de un grupo metoxilo.

Dada la información anterior, se identificó a **IIa**, como una mezcla de ácidos grasos insaturados libres así como, de ésteres metílicos de ácidos grasos insaturados. Además se infirió la presencia de triacilglicerol, por la señal en δ_H 5.34 y 4.11-4.31 pertenecientes a los H-1, H-2 y H-3 de triacilglicerol.

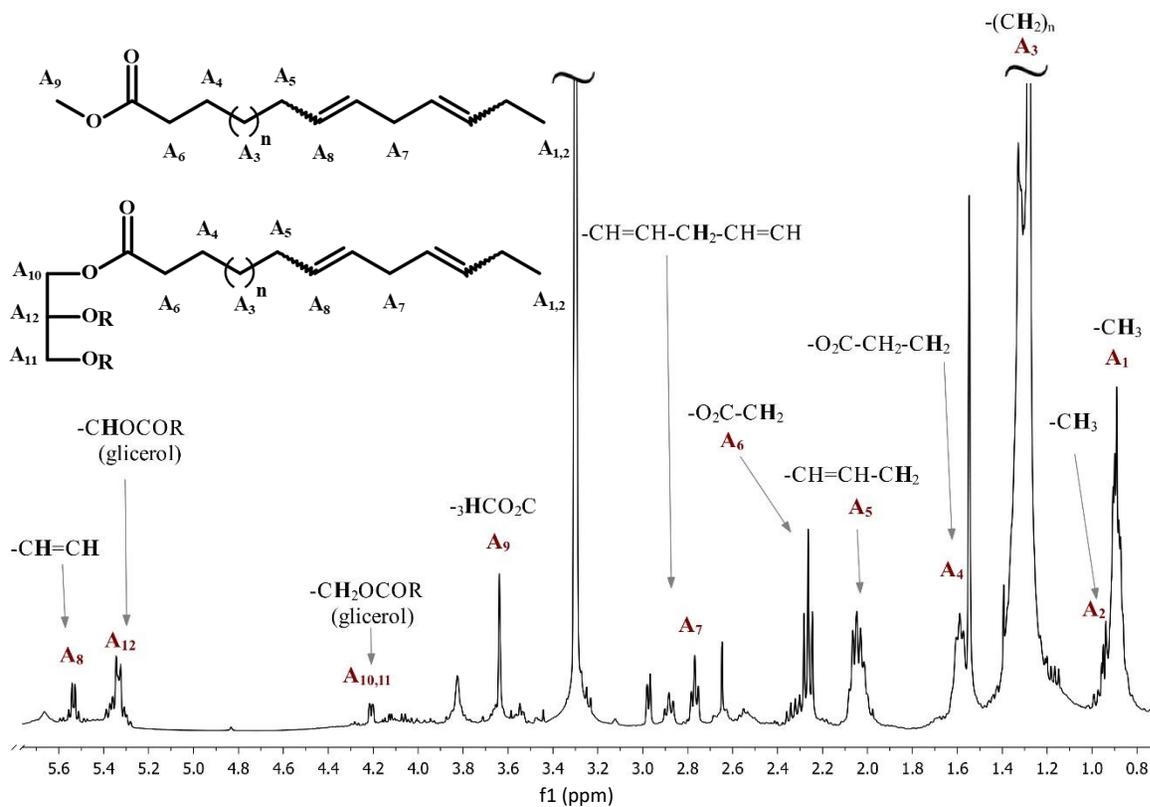


Figura 24. Espectro de RMN- ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de **IIa**. El símbolo virgulilla hace referencia a que hubo un corte en la parte superior del espectro.

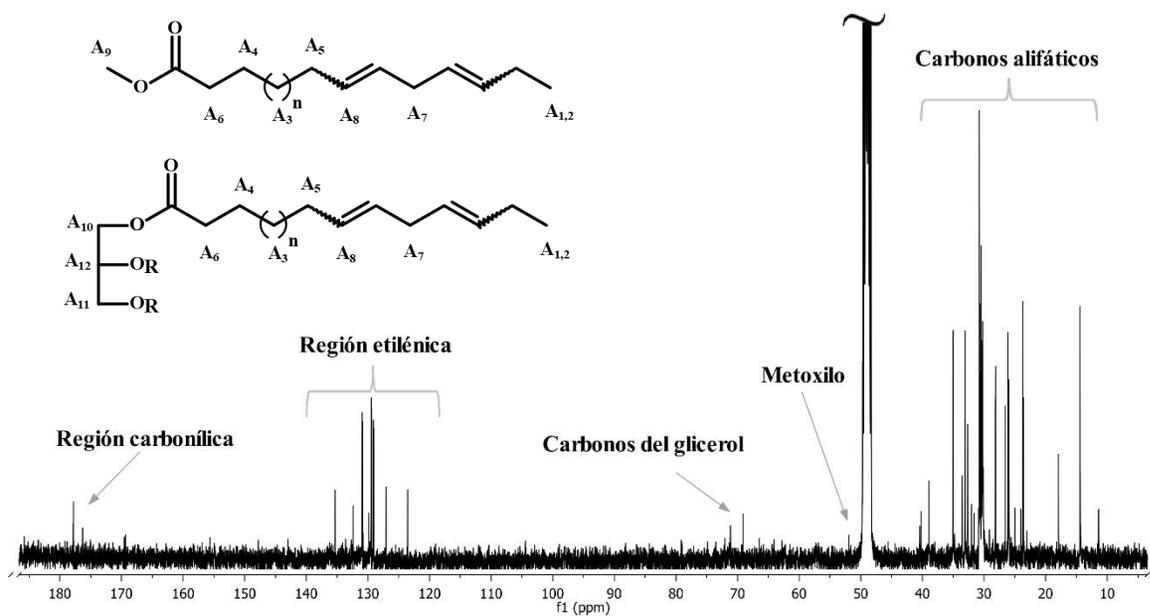


Figura 25. Espectro de RMN- ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de **IIa**. El símbolo virgulilla hace referencia a que hubo un corte en la parte superior del espectro.

IIb se obtuvo como un líquido viscoso de color amarillo. Al realizar el análisis de sus desplazamientos químicos de RMN-¹H (400 MHz en CDCl₃) Figura 26, se apreció una gran similitud con los desplazamientos químicos de protón de **IIa**, indicando la presencia de mezclas de ácidos grasos insaturados y triacilgliceroles. En el apéndice 1-a se muestra su espectro de RMN-¹³C de **IIb**.

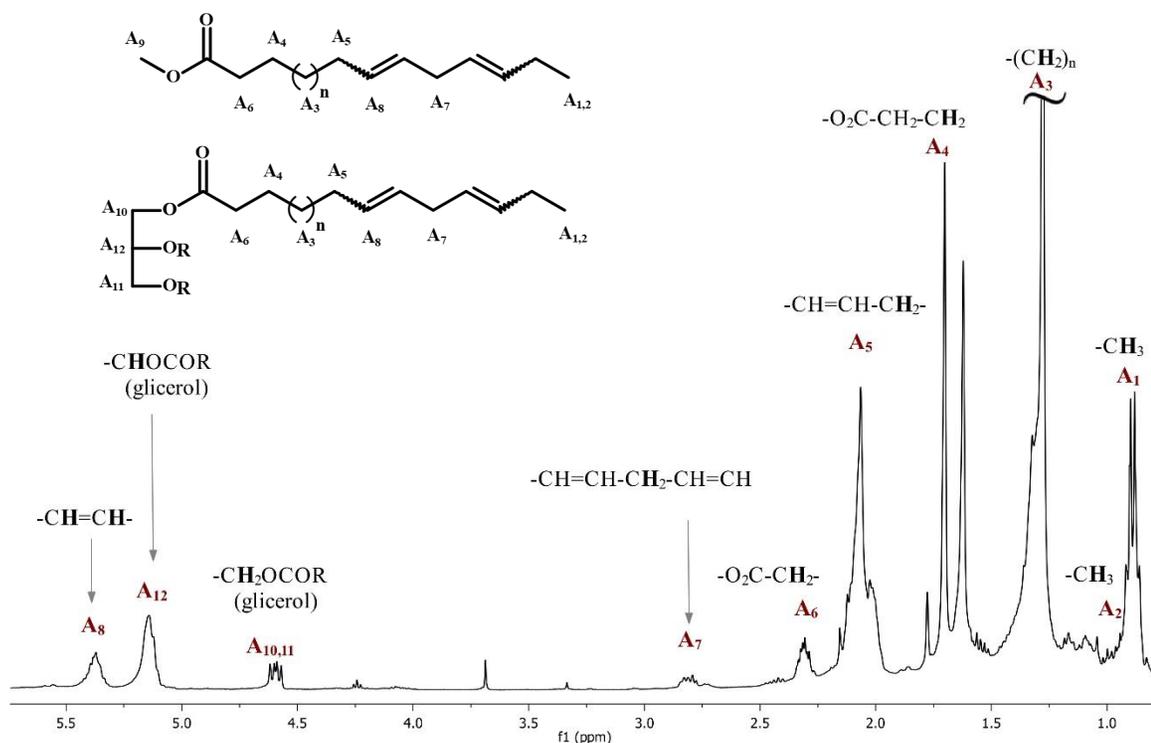


Figura 25. Espectro de RMN-¹H en CDCl₃ a 400 MHz de **IIb**. El símbolo virgulilla hace referencia a que hubo un corte en la parte superior del espectro.

Este tipo de compuestos son comunes en todas las familias de plantas y en mayor cantidad en semillas de frutos. La familia Euphorbiaceae está considerada como fuente de aceites vegetales para la industria tecnológica (Correal y Pascual 1992).

4.2.6 Elucidación estructural de III

Del análisis del espectro de RMN- ^1H , Figura 27, de las fracciones 24-27 proveniente del extracto A1'' se determinó que hay una mezcla de ácidos grasos insaturados y derivados de ftalatos.

En relación a la porción de ftalato, sus señales se observaron en la región de los aromáticos, como dos dobles de dobles en δ_{H} 7.72 y 7.55 ($J = 3.6, 3.3$ Hz; $J = 3.6, 3.3$ Hz, respectivamente), característico de un benceno 1,2-disustituido. También se observó una señal triple en δ_{H} 4.24 ($J = 5.9$ Hz), estas señales corresponden a protones de metilenos unidos a oxígeno. El resto de las señales de la porción alifática, estuvieron inmersas en las señales de los protones de los ácidos grasos en δ_{H} 0.83-1.94 (Guillén y Ruiz, 2003).

Los ésteres de ácido ftálico comúnmente conocidos como ftalatos, son una familia de productos químicos artificiales utilizados como plastificantes en una variedad de productos industriales. Sin embargo, algunos géneros de la familia Euphorbiaceae producen ftalatos como sus metabolitos secundarios. Por ejemplo, se han aislado ftalatos como butil-2-metilpropil, diheptil y bis (2-etilhexil), bis (2-etiloctil) y bis (2-etilicosil) en *Euphorbia cyparissias*, *E. seguieriana*, *E. hylonoma* y *Phyllanthus muellerianus* (Toth-Soma *et al.*, 1993; Ruan *et al.*, 2006; Saleem *et al.*, 2009) tanto de la parte aérea como en raíz. A pesar de ello, hasta el momento la biosíntesis y el papel fisiológico de los ftalatos en especies vegetales no están reportado.

Debido al sitio de su colecta (en un jardín botánico), un área natural con mínima perturbación, y a los cuidados restantes para evitar cualquier contaminante de ftalatos durante el proceso de separación de los MS, podría ser probable que los ftalatos hayan sido sintetizados por la planta, no obstante, falta examinar su mecanismo de producción de estos compuestos en *A. cuspidata* para descartar con certeza su procedencia externa.

Los ftalatos tienen actividad antibacteriana, larvívica y citotóxica significativa (Rajamanikyam *et al.*, 2017). También, inhiben la acción de las TOP I y II dependiente de la dosis, casi tan potente como la camptotecina y m-AMSA (Lee y Hong 1996). Considerando lo anterior, es conveniente verificar si la actividad antitopoisomerasa (Lira-De León *et al.*, 2017; Herrera-Martínez, 2010, 2016) en *A. cuspidata* se debe en parte a la

presencia de ftalatos o no, ya que los ftalatos en *A. cuspidata* se encontraron en las diferentes partes estudiadas (hojas-flores, tallos y raíces).

Por otra parte, las señales generadas por los protones de los ácidos grasos (Figura 27), se observaron a frecuencias bajas, alrededor de δ_H 0.7-0.9 se identificaron protones de metilos, en δ_H 1.1-2.3 se apreciaron señales múltiples que corresponden a los hidrógenos de los grupos metilenos ($-\text{CH}_2$) de una cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos y del ftalato. También en el intervalo de δ_H 5.7-5.9 se mostraron señales múltiples correspondientes a protones vinílicos, así mismo se observó una señal simple en δ_H 3.68 indicando la presencia de un grupo metoxilo en la estructura.

En δ_H 2.33 se apreció una señal múltiple, este desplazamiento es típico de protones vecinos a un grupo éster y con base a lo ya descrito, se sugirió que se trata de un éster metílico de un ácido graso insaturado.

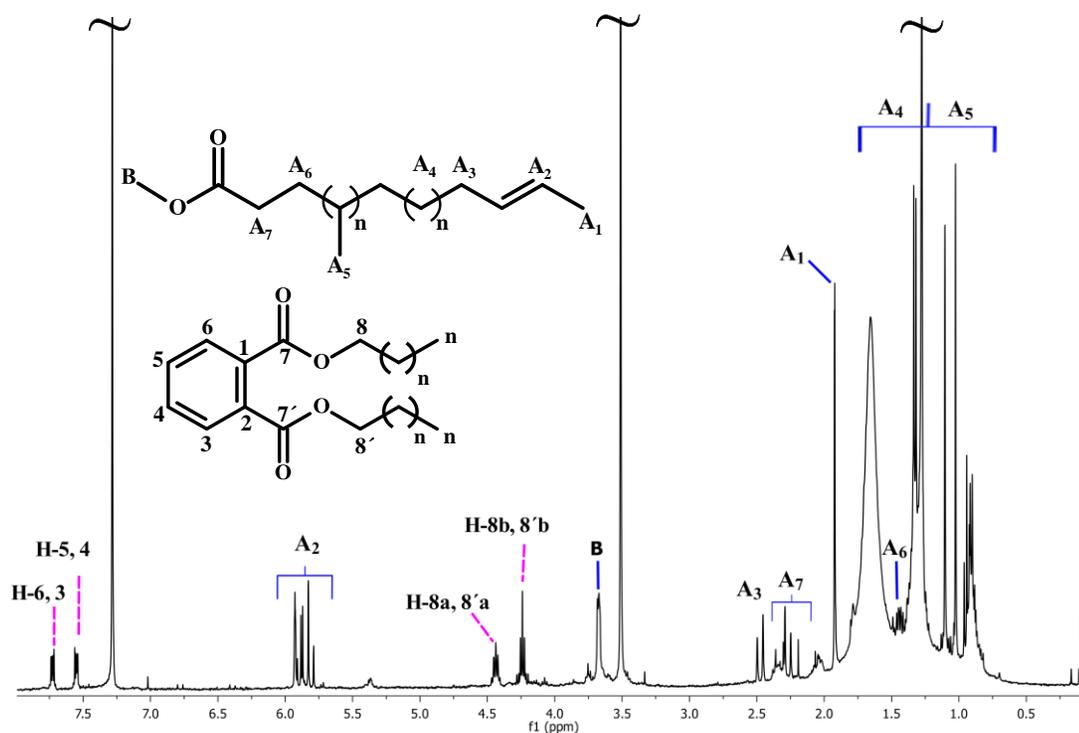


Figura 27. Espectro de RMN- ^1H en MeOD a 400 MHz de las fracciones 24-27 de hojas-flores (A). Las señales indicadas con líneas discontinuas pertenecen a los protones del ftalato, y con las líneas continuas, corresponden a las del ácido graso insaturado. El símbolo virgulilla hace referencia a que hubo un corte en la parte superior del espectro.

4.2.7 Elucidación estructural de IVa

De la fracción soluble en agua del crudo MeOH ($A_{1''}$), se obtuvo **IVa**. Del análisis de los desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C y la comparación con lo reportado por Li *et al.* (1999), se propuso la existencia de un derivado del ácido elágico en mezcla, Figura 28.

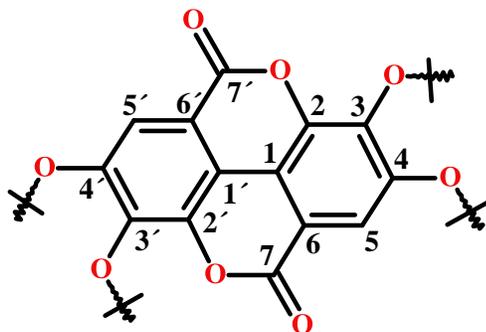


Figura 28. Estructura química de un derivado del ácido elágico (**IVa**).

Dado que la molécula del ácido elágico tiene simetría, se identificaron sólo seis señales que corresponde a la mitad de dicha molécula, el resto tiene el mismo ambiente químico. La presencia de carbonilos de lactona (C_7 , y $C_{7'}$) se confirmó con la señal en δ_C 159.9, se asignaron los carbonos metinos aromáticos (C_5 , y $C_{5'}$) en δ_C 110.2. El resto de las señales identificadas, correspondieron a carbonos cuaternarios de aromáticos (sp^2), Figura 29.

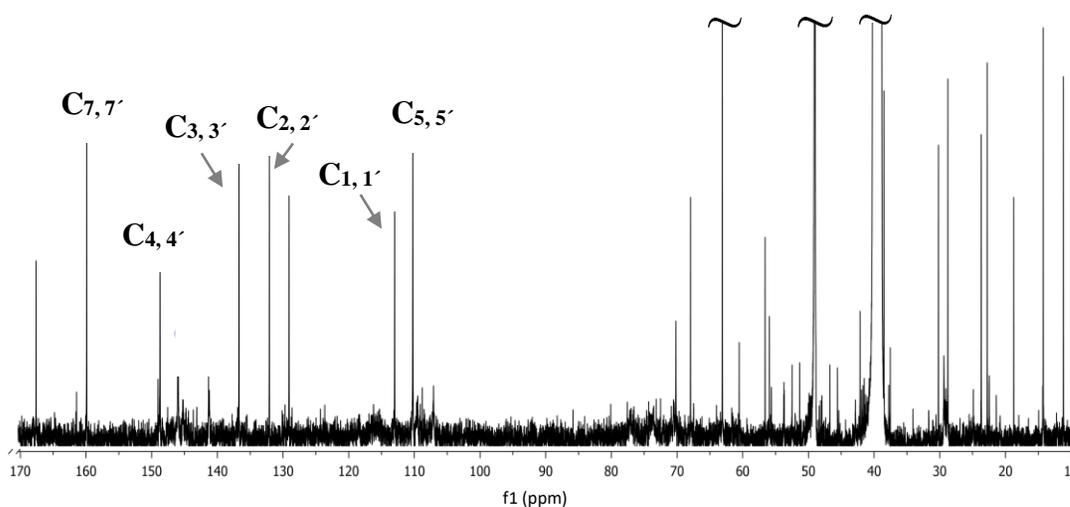


Figura 29. Espectro de RMN- ^{13}C en DMSO- d_6 a 100 MHz de **IVa** en mezcla. El símbolo virgulilla hace referencia a que hubo un corte en la parte superior del espectro.

Los precursores de **IVa** son los taninos, y la familia Euphorbiacea es rica en taninos (Okuda *et al.*, 1980). La presencia de derivados del ácido elágico presentes en la fracción acuosa en el género *Acalypha*, también ha sido reportado por Kewuchi *et al.* (2011) en concentraciones de 518.19 (mg/kg).

4.2.8 Elucidación estructural de IVb

La fracción uno, proveniente de la columna C₁₈ del extracto **A1'''** se obtuvo como un líquido viscoso de color amarillo, con un peso de 5.3 mg representando el 0.43 % de dicho extracto. En el espectro de RMN-¹H, Figura 30, se observaron señales en la región de protones aromáticos, así como, señales de protones anoméricos, sin embargo, mediante el análisis del experimento HMBC se observó que no hay correlación entre los protones anoméricos de la glicona con los protones del sistema aromático. Por lo tanto, ambos sistemas, estuvieron en moléculas diferentes.

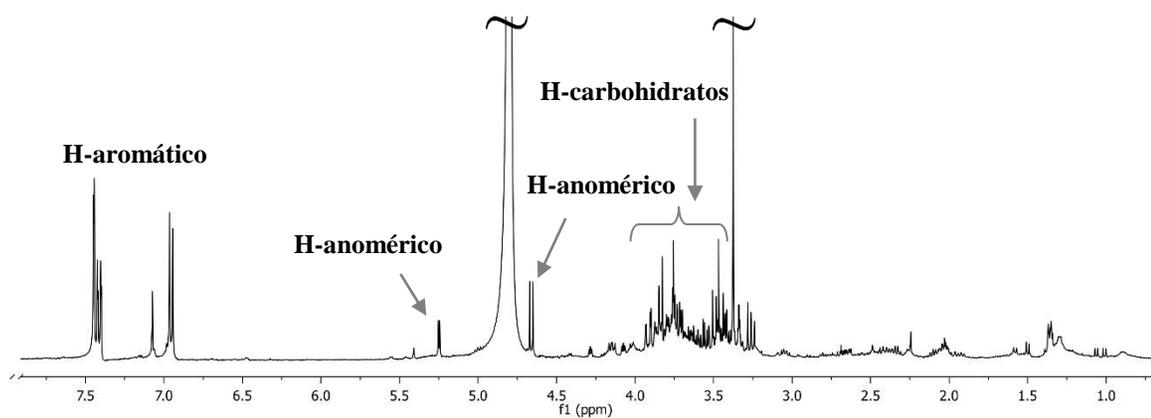


Figura 30. Espectro de RMN-¹H en D₂O a 400 MHz de la fracción uno, proveniente del extracto **A1'''**. El símbolo virgüilla hace referencia a que hubo un corte en la parte superior del espectro.

Continuando con la elucidación en la región de protones aromáticos, se observaron señales en δ_H 7.45 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), δ_H 6.95 (1H, d, $J = 8.2$ Hz) y δ_H 7.41 (1H, dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz) asignados a H₂, H₅ y H₆, respectivamente, y mediante HSQC (apéndice 1-b) se observó que dichas señales se encuentran unidas directamente a los carbonos en δ_C 117.0 (C₂); δ_C 115.3 (C₅) y δ_C 122.6 (C₆), respectivamente. Este conjunto de tres señales forman parte de un sistema de espín ABX propio de un anillo aromático. Las

correlaciones de H₂ a C₆, C₃, C=O; H₆ a C₂, C₄ y de H₅ a C₁, C₃ observadas en el espectro HMBC, Figura 31, y con lo ya reportado, confirmaron la presencia del ácido 3,4-dihidroxibenzoico, también conocido como ácido protocatechuico (**IVb**) (Scott, 1970; 1972).

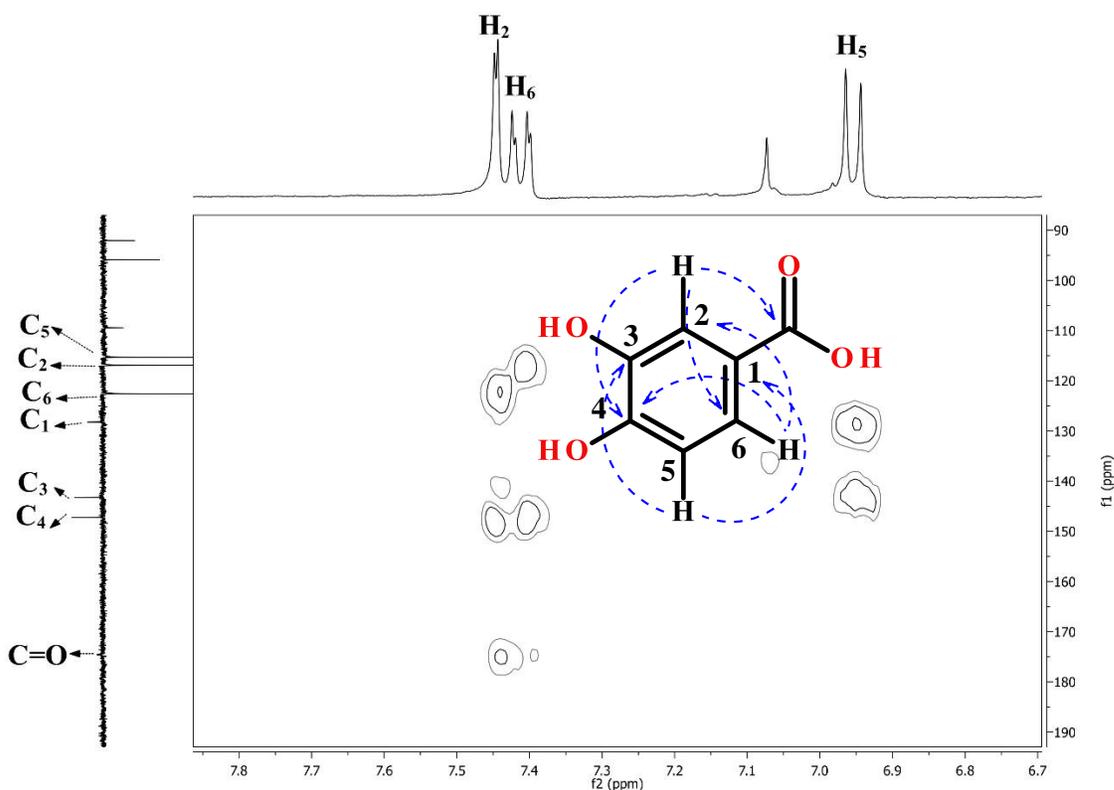


Figura 31. Espectro HMBC en D₂O del ácido 3,4-dihidroxibenzoico (**IVb**), sus correlaciones se muestran con flechas discontinuas.

El ácido 3,4-dihidroxibenzoico, un compuesto fenólico, ya se ha aislado en otra especie del género *Acalypha* (Park *et al.*, 1993), sin embargo en *A. cuspidata* es la primera vez que se reporta. Entre sus propiedades biológicas se describe la actividad antioxidante (Sroka *et al.*, 2003) y nematocida (Seo *et al.*, 2013). En el cuadro 7, se resumen todos los desplazamientos químicos de ¹H y ¹³C.

Cuadro 7. Datos espectroscópicos de RMN-¹H [δ en ppm, multiplicidad, (J en Hz)] y ¹³C (400 y 100 MHz, respectivamente) del ácido 3,4-dihidroxibenzoico (**IVb**) en D₂O.

Posición	δ_C	δ_H	HSQC	HMBC _{H-C}
C=O	175.1	-	-	-
1	128.2	-	-	-
2	117.0	7.45, d, ($J = 1.9$)	117.0	122.6, 143.3, 175.1
3	143.2	-	-	-
4	147.2	-	-	-
5	115.3	6.95, d, ($J = 8.2$)	115.3	128.2, 143.2
6	122.6	7.41, dd, ($J = 8.2, 1.9$)	122.6	116.9, 147.2

Multiplicidad: d = doble, dd = doble de dobles.

4.2.9 Elucidación estructural de V

Del extracto de AcOEt desengrasado (sección 3.2.2) pasado por C₁₈ se obtuvo el espectro de RMN-¹H Figura 32, de las fracciones 30-32 (18 mg, en los apéndices 1-c y d, se encuentra el resto de sus experimentos), que mostró protones metilénicos entre δ_H 0.63-1.1 con el perfil característico de un fitoesterol, se observó una señal triple en δ_H 5.34 (t, $J = 2.4$ Hz) característico del protón vinílico H₆ de un esterol (Sobolev *et al.*, 2005). También se observaron protones vecinales a hidroxilo en δ_H 4.02-4.56 lo cual sugiere la presencia de un azúcar. En δ_H 5.04 se identificó el protón anomérico (H_{1'}), esto se confirmó con la señal en δ_C 102.3 de RMN-¹³C correspondiente al carbono anomérico. Con la ayuda de los espectros de HMBC y HSQC todas las señales fueron asignadas y con la comparación con datos de la literatura (Faizi *et al.*, 2001), se identificó el compuesto **V** como 3-*O*- β -D-glucopiranosido del β -sitosterol. En el Cuadro 8, se muestran los desplazamientos químicos de este compuesto.

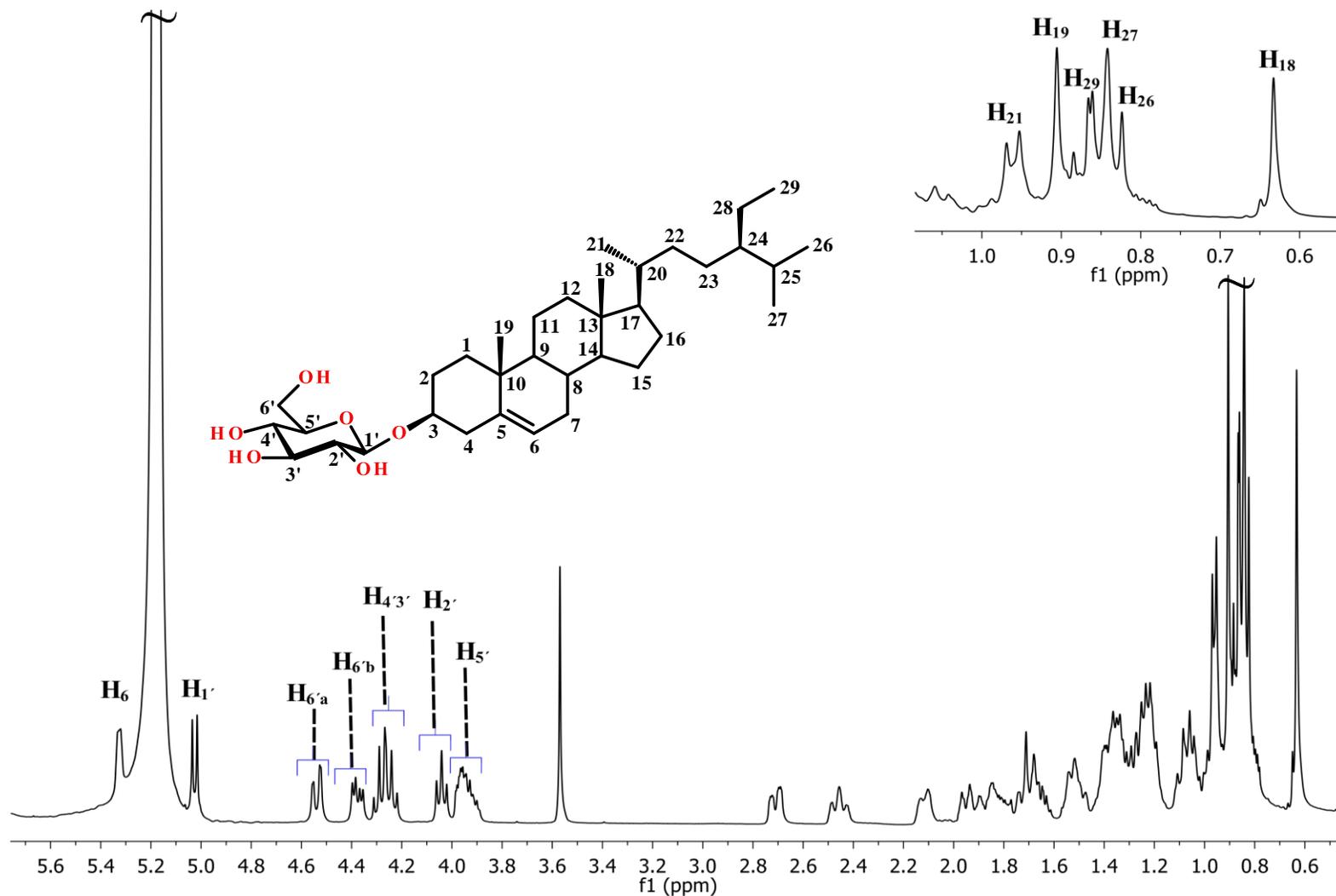


Figura 32. Espectro de RMN- ^1H a 400 MHz en piridina- d_5 de 3-O- β -D-glucopiranosido del β -sitosterol (V). La expansión de la región δ_{H} 0.60-1.01 (parte superior derecha de la Figura) permite apreciar las señales de los protones metilénicos del β -sitosterol. El símbolo virgulilla hace referencia a que hubo un corte en la parte superior del espectro.

El compuesto **V** se ha reportado dentro de la familia Euphorbiaceae, específicamente en los géneros *Euphorbia* (Moawad *et al.*, 2016), *Nealchornea* (Sarath *et al.*, 1980) y en *Croton* (Peres *et al.*, 1997), pero no hay reportes para el género *Acalypha*.

Cuadro 8. Datos espectroscópicos de RMN-¹H [δ en ppm, multiplicidad, (J en Hz)] y ¹³C (400 y 100 MHz, respectivamente) de 3-*O*- β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (**V**) en piridina-*d*₅.

Posición	δ_C	δ_H	HSQC	HMBC _{H-C}
1	37.3	0.97, m 1.72, m	37.3	-
2	30.0	2.13, d, ($J = 11.6$) 1.70, m	30.0	-
3	77.9	3.96, m	77.9	-
4	39.1	2.46, dd, ($J = 13.6, 2.0$) 2.72, dd, ($J = 13.2, 2.4$)	39.1	-
5	140.7	-	-	-
6	121.6	5.34, t, ($J = 2.4$)	121.7	31.8
7	32.0	1.53, m 1.82, m	32.0	-
8	31.8	1.48, m	31.8	32.2, 41.7, 56.0, 121.8, 140.8
9	50.1	0.85, dd, ($J = 6.8, 3.2$)	50.3	-
10	36.7	-	-	-
11	21.1	1.40, m 1.40, m	21.1	-
12	39.7	1.93, m 1.07, m	39.8	-
13	42.0	-	-	-
14	56.6	0.90, m	56.0	-
15	24.3	1.51, m 1.01, m	24.3	-
16	28.3	1.79, m 1.20, m	28.4	-
17	56.6	1.05, m	56.0	-
18	11.8	0.64, s	11.8	-
19	19.8	0.92, s	19.8	-
20	36.2	1.32, m	36.2	-
21	18.8	0.97, d, ($J = 6.4$)	18.7	-
22	34.0	1.07, m 1.34, m	34.0	-
23	26.2	1.24, m 1.24, m	26.2	-
24	45.8	0.97, m	45.8	-
25	29.2	1.65, m	29.3	-

Cuadro 8. (Continuación)

Posición	δ_C	δ_H	HSQC	HMBC _{H-C}
26	19.0	0.83, s	19.2	-
27	19.2	0.85, s	19.7	-
28	23.2	1.26, m	23.2	-
		1.26, m		
29	12.0	0.89, d ($J = 2.0$)	12.0	-
1'	102.3	5.04, d, ($J = 7.6$)	102.3	77.9
2'	75.1	4.05, dd ($J = 7.6, 8.0$)	75.1	
3'	78.3	4.28, dd ($J = 8.0, 8.0$)	78.3	75.1
4'	71.5	4.26, dd, ($J = 8.0, 8.0$)	71.5	78.3, 78.2
5'	78.2	3.96, m	78.2	102.3
6'a	62.6	4.55, dd, ($J = 11.6, 1.6$)	62.5	71.5
6'b	62.6	4.39, dd, ($J = 11.6, 5.2$)	62.5	78.3

Multiplicidad: m = múltiple, s = simple, t = triple, d = doble, dd = doble de dobles

4.2.10 Elucidación estructural de VI

Por otro lado, de las fracciones que se obtuvieron de tallo (**B1'**), solo las que presentaron compuestos mayoritarios con algunas impurezas (8, 43-45, 46, 51 y 52) fueron las que se analizaron mediante RMN-¹H.

Los espectros de RMN-¹H de las fracciones 8 y 43-45 no se presentan, ya que mostraron desplazamientos químicos muy parecidos a los de la fracción 46. La fracción 46 se obtuvo como un aceite de color amarillo intenso, soluble en MeOH. En el espectro de RMN-¹H, Figura 33, se observaron señales principalmente de carotenos y de triacilglicerol.

Los protones olefínicos conjugados de la gran mayoría de los carotenoides se observaron con intensidades bajas en la región entre δ_H 6.0-6.8, mientras que las señales pertenecientes a metilos y metilenos fueron traslapadas por las señales intensas correspondientes a los triacilglicerol, debido a esto, sólo fue posible analizar dicha región (δ_H 6.0-6.8). Las asignaciones realizadas, se basaron en la literatura disponible (Miglietta y Lamanna, 2006).

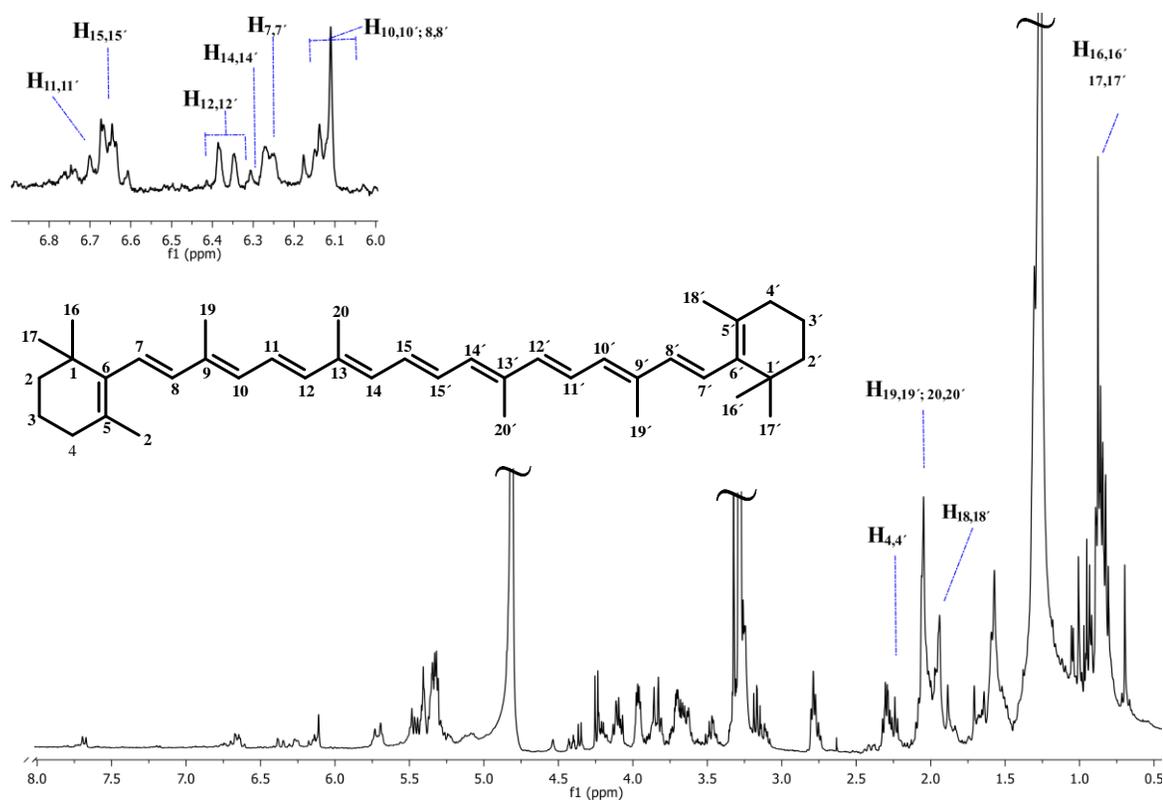


Figura 33. Espectro de RMN- ^1H en MeOD a 400 MHz de β -caroteno (**VI**) de *A. cuspidata*, presente en la fracción 46 de tallo. En la parte superior izquierda se muestra una ampliación correspondiente a la zona de protones vinílicos (δ_{H} 6.0-6.8) de **VI**. El símbolo virgulilla hace referencia a que hubo un corte en la parte superior del espectro.

Continuando con la elucidación de la fracción 46, se discutieron las siguientes señales: se identificaron 11 señales características de triacilgliceroles (Guillén y Ruiz, 2003), mismas que se observaron para los compuestos **IIa** y **IIb** aislado en hojas (extracto **A**), el análisis de los desplazamientos del espectro de RMN- ^1H , Figura 34, se apreciaron señales del esqueleto del glicerol. Por lo tanto, las señales 1 y 3 (δ_{H} 4.11-4.25) se deben a los protones de los carbonos 1 y 3 del grupo glicerilo (CH_2OCOR) y mientras que 2 (δ_{H} 5.32) al protón del carbono 2 ($-\text{CHOCOR}$).

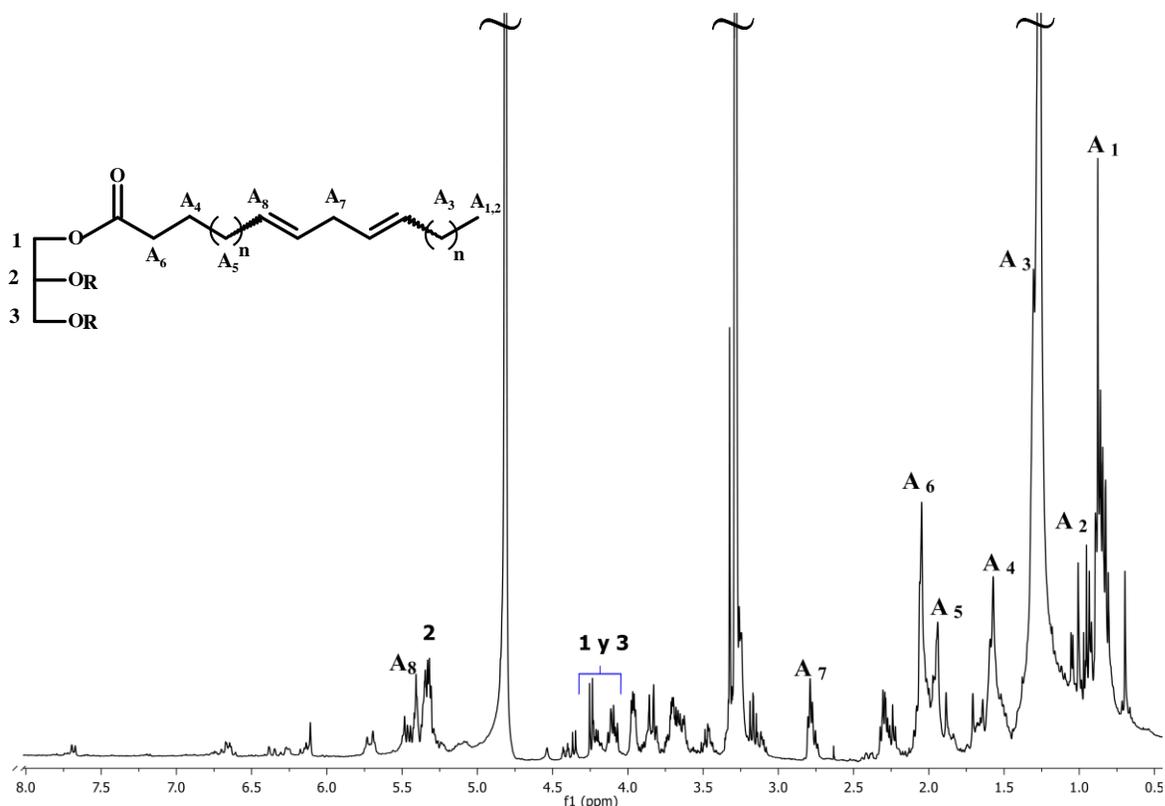


Figura 34. Espectro de RMN- ^1H en MeOD a 400 MHz de mezcla de triacilglicérols presente en la fracción 46, proveniente de tallo de *A. cuspidata*. El símbolo virgulilla hace referencia a que hubo un corte en la parte superior del espectro.

4.2.11 Elucidación estructural de VII

La fracción 51, se obtuvo como un sólido blanco cristalino. En el espectro de RMN- ^1H , Figura 35, se observaron señales de protones metilénicos a frecuencias bajas, entre δ_{H} 0.63-1.01 con el perfil característico de un fitoesterol (Sobolev *et al.*, 2005): δ_{H} 0.69 (H_{18}), δ_{H} 0.80 (H_{26}), δ_{H} 0.82 (H_{27}), δ_{H} 0.84 (H_{29}), δ_{H} 0.92 (H_{19}) y δ_{H} 1.01 (H_{21}). También se observó una señal múltiple en δ_{H} 3.52, perteneciente a un hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo, señal clave que evidenció la posición de H_3 del anillo esteroidal. En δ_{H} 5.35 se observó una señal doble ($J = 5.2$ Hz) de un protón vinílico (H_6). Además, en δ_{H} 5.15 ($J = 15.2, 8.8$ Hz) y en δ_{H} 5.01 ($J = 15.2, 8.8$ Hz) se distinguieron dos señales doble de dobles, características para protones vinílicos, pertenecientes a los protones H_{22} y H_{23} , respectivamente. Estas asignaciones coincidieron con las reportadas para la estructura del estigmasterol (VII) (Sobolev *et al.*, 2005).

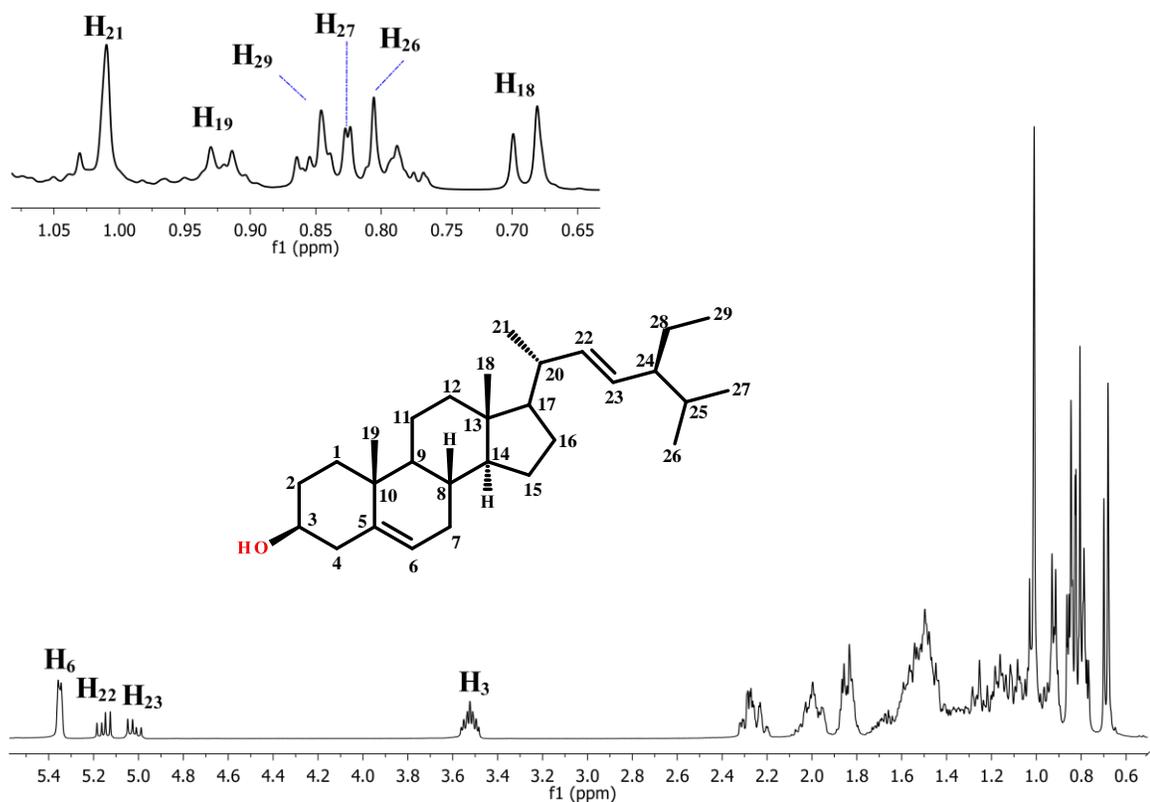


Figura 35. Espectro de RMN- ^1H en CDCl_3 a 400 MHz del estigmasterol (**VII**), presente en la fracción 51 de *A. cuspidata*.

4.2.12 Elucidación estructural de **VIII**

Los espectros de RMN- ^1H de las fracciones 51 y 52 presentaron desplazamientos químicos parecidos, excepto que, la intensidad de las señales en δ_{H} 5.02-5.16 para 52 fueron bajas en contraste con las de la fracción 51, además, que las señales a frecuencias bajas (δ_{H} 0.63-1.01) integraron para el doble de protones esperados. Basados en las integrales e intensidades de las mismas, se afirmó que la fracción 52 (Figura 36) presentó señales para una mezcla de dos compuestos. Por lo que, las señales de mayor intensidad se atribuyeron al compuesto mayoritario, β -sitosterol (**VIII**) mientras que las de menor intensidad al estigmasterol (**VII**).

Estos dos fitoesteroles son de importancia médica y también biológica. Son componentes estructurales de la membrana celular, presentes en forma libre o esterificada. En hojas-flores (**A**) se aisló el β -sitosterol glicosilado (3-*O*- β -D-glucopiranósido del β -sitosterol, **V**), Ullmann *et al.* (1993) sugieren que la glucosilación de esteroides según las necesidades

celulares, puede representar una vía de regulación con el fin de equilibrar la concentración de esteroides libres en la membrana plasmática. Cabe señalar que la enzima encargada de la glucosilación de esteroides en vegetales es UDP-glucosa β -D-glucosiltransferasa (UDPG-SGTasa) mediante la transferencia de glucosa de UDP-glucosa a un esteroide con la formación de un enlace β -glucosídico entre el carbono anomérico de la glucosa y el grupo 3-hidroxilo del esteroide. Aunque β -sitosterol y estigmasterol han sido aislados de muchas especies vegetales, para *A. cuspidata* constituyen su primer reporte.

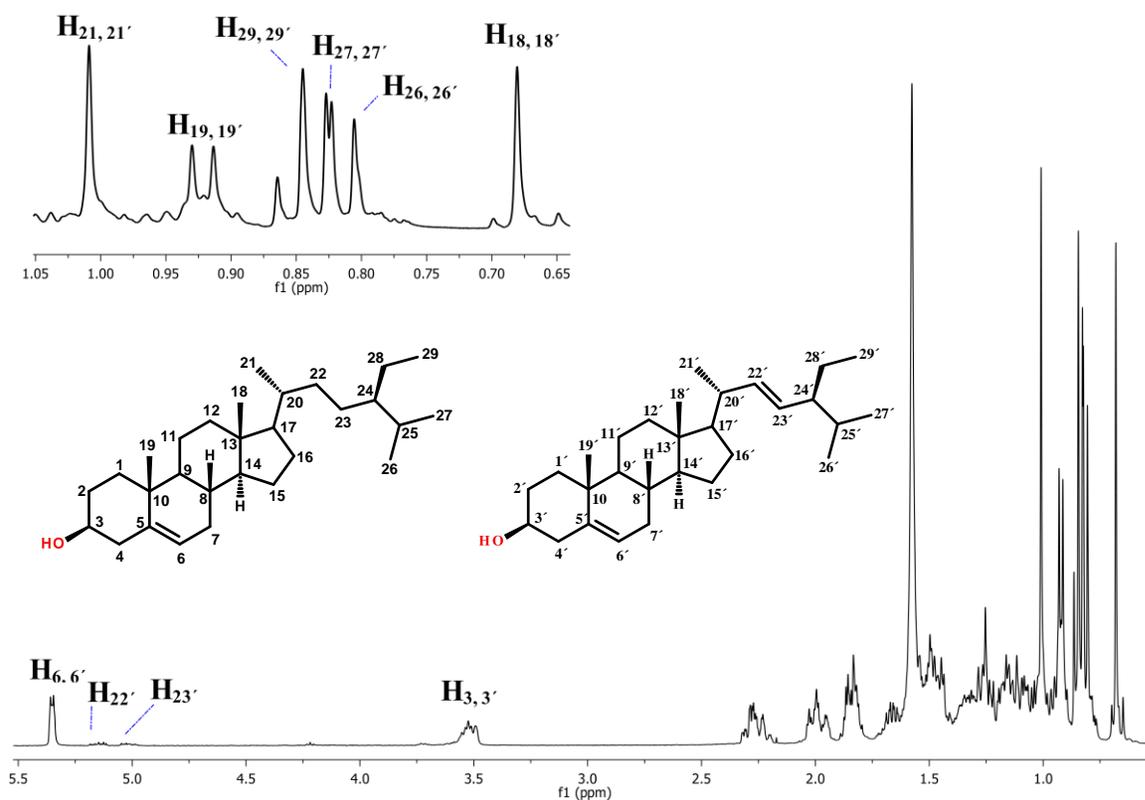


Figura 36. Espectro de RMN- ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de la mezcla de β -sitosterol (**VIII**) y estigmasterol (**VII**) presentes en la fracción 52 de tallos *A. cuspidata*.

Por otro lado, de la fracción soluble en Hx (**B2'**), se formó un precipitado, se lavó con MeOH resultando un sólido blanco cristalino, y al agregarle CHCl_3 con acetona, cristalizó. Se analizó por RMN- ^1H e identificó nuevamente a β -sitosterol (**VIII**) y estigmasterol (**VII**). Con un peso de 190 mg representando el 45.23 % de la fracción de Hx.

4.2.13 Elucidación estructural de IX

El fraccionamiento cromatográfico de C''' (de raíz), permitió obtener los compuesto **IX** y **X**.

La fracción 37, se obtuvo como cristal en forma de aguja. En el espectro de RMN-¹H, Figura 37, de **IX**, se identificaron dos señales simples, de protones de aromáticos en δ_H 7.92 (1H, s, δ_C 114.0) y 7.60 (1H, s, δ_C 113.2) y se asignaron a H₅ y H_{5'}, respectivamente.

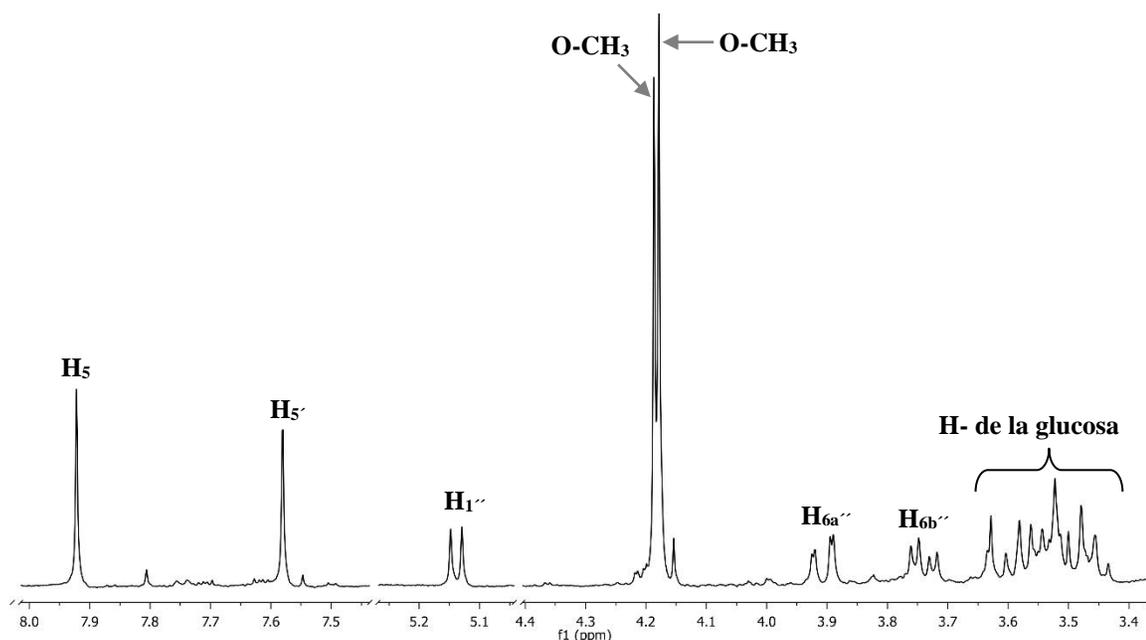


Figura 37. Espectro de RMN-¹H en MeOD a 400 MHz, del compuesto **IX** presente en la fracción 37 de raíz *A. cuspidata*.

Mediante HMBC, se observó que H₅ se correlacionó con 116.2, 144.0, 153.0, 160.5 (C₆, C₃, C₄, C₇) mientras que H_{5'} con 112.9, 142.0, 154.4, 160.4 (C_{6'}, C_{3'}, C_{4'}, C_{7'}). También se observó la presencia de dos metoxilos en δ_H 4.19 (3H, s, δ_C 62.6) y δ_H 4.18 (3H, s, δ_C 62.1) y se correlacionaron con 144.0 (C₃) y 142.0 (C_{3'}). Las correlaciones mencionadas se muestran en la Figura 38.

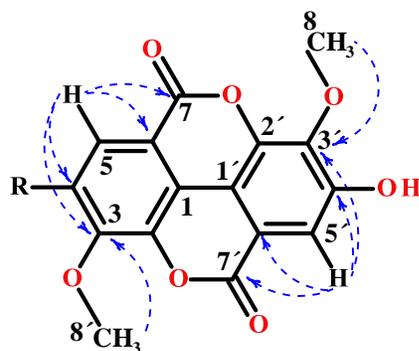


Figura 38. Correlaciones claves por HMBC de **IX**.

R: parte restante de la molécula en elucidación.

Finalmente, se identificó el protón anomérico de la glucosa en δ_H 5.14 (1H, d, $J = 7.4$ Hz) y sus protones diasterotópicos del $C_{6''}$ (62.3) en δ_H 3.91 (1H, dd, $J = 12.1, 1.9$ Hz) y δ_H 3.74 (1H, dd, $J = 12.1, 5.2$ Hz). La posición del enlace glucosídico al resto del núcleo del ácido elágico se confirmó mediante los experimentos HMBC y NOESY, por la corrección observada del H_5 con el carbono anomérico ($C_{1''}$) Figura 39. Mientras que la correlación de $H_{1''}$ (δ_H 5.14) con C_4 (δ_C 153.0) indicó el punto de conexión (C_4).

Por los datos espectroscópicos descritos anteriormente y según lo reportado (Ye *et al.*, 2007 y Zhou *et al.*, 2015) **IX** se identificó como 4-*O*- β -D-glucopiranosido del ácido 3,3'-dimetil-elágico. El resto de sus experimentos se encuentran en los apéndices 1-e-g.

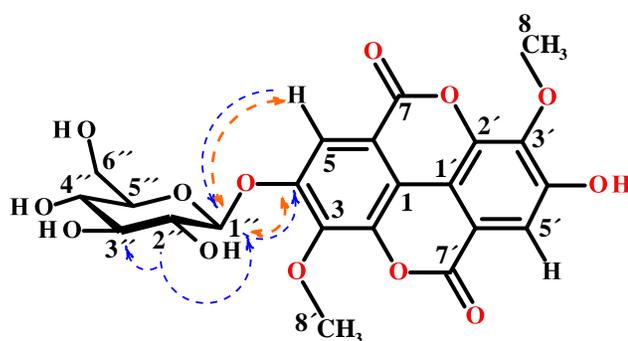


Figura 39. Correlaciones claves por HMBC (flecha de una punta) y NOESY (flecha de dos puntas) del compuesto **IX**.

Cabe destacar que **IX**, no está descrito en la familia Euphorbiaceae ni en el género *Acalypha*. Sin embargo, dentro del género hay compuestos estructuralmente muy

parecidos que difieren en el azúcar unido al grupo hidroxilo, en la posición 4. Por ejemplo de las raíces de *Euphorbia hylonoma* se aisló el 4'-*O*- β -D-xilopiranosido del ácido 3,3'-di-*O*-metil-elágico, con actividad antitumoral (Zhang *et al.*, 2014). Por lo tanto, en este estudio se aisló por primera vez el 4-*O*- β -D-glucopiranosido del ácido 3,3'-dimetil-elágico. En el Cuadro 9, se muestran todos los desplazamientos de protones y átomos de carbono.

Cuadro 9. Datos espectroscópicos de RMN-¹H [δ en ppm, multiplicidad, (*J* en Hz)] y ¹³C (400 y 100 MHz, respectivamente) de 4-*O*- β -D-glucopiranosido del ácido 3,3'-dimetil-elágico (**IX**) en CD₃OD.

Posición	δ_H	δ_C	HSQC	HMBC _{H-C}	NOESY	DEPTQ
1	-	114.4	-	-	-	C
2	-	143.0	-	-	-	C
3	-	144.0	-	-	-	C
4	-	153.0	-	-	-	C
5	7.92, s	114.0	114.0	116.2, 144.0, 153.0, 160.5	5.14	CH
6	-	116.2	-	-	-	C
7(COO)	-	160.5	-	-	-	C
8 (CH ₃)	4.19, s	62.6	62.65	144.0	-	CH ₃
1'	-	113.5	-	-	-	C
2'	-	142.7	-	-	-	C
3'	-	142.0	-	-	-	C
4'	-	154.4	-	-	-	C
5'	7.60, s	113.2	113.1	112.9, 142.0, 154.4, 160.4	-	CH
6'	-	112.9	-	-	-	C
7'(COO)	-	160.4	-	-	-	C
8'(CH ₃)	4.18, s	62.1	62.1	142.0	-	CH ₃
1''	5.14, d, (<i>J</i> = 7.5)	103.0	103.0	153.0	7.92	CH
2''	3.46, m	74.92	74.92	78.1, 103.0	-	CH
3''	3.51, m	78.1	78.1	-	-	CH
4''	3.55, m	71.1	71.1	78.1	-	CH
5''	3.63, m	78.4	78.4	-	-	CH
6''	a: 3.91, dd, (<i>J</i> = 12.1, 1.9) b: 3.74, dd, (<i>J</i> = 12.1, 5.2)	62.3	62.3	-	-	CH ₂

Multiplicidad: s = simple, t = triple, d = doble, dd = doble de dobles.

4.2.14 Elucidación estructural de X

De la fracción 39, de raíz, se aisló el compuesto **X**, como un sólido color ámbar, soluble en metanol. Las asignaciones se hicieron analizando los experimentos de RMN 1D y 2D: ^1H y ^{13}C , DEPTQ, ^1H - ^1H COSY, HSQC y HMBC. Del análisis de los datos espectroscópicos, en conjunto con lo reportado por Jiang *et al.* (2015) se propuso una amida derivada del ácido ferúlico y tiramina de nombre (*E*)-*N*-feruloil tiramina (**X**). A continuación se describe su elucidación.

En el espectro de RMN- ^1H , Figura 40, se observaron señales de protones aromáticos en δ_{H} 7.10 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), δ_{H} 6.78 (1H, d, $J = 8.1$ Hz) y δ_{H} 7.01 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz) asignados a H_5 , H_8 y H_9 , respectivamente, y de acuerdo a las correlaciones observadas en el experimento HSQC, se estableció que estos protones se encuentran enlazados a sus respectivos carbonos C_5 , C_8 y C_9 en δ_{C} 111.5, 116.4 y 123.2.

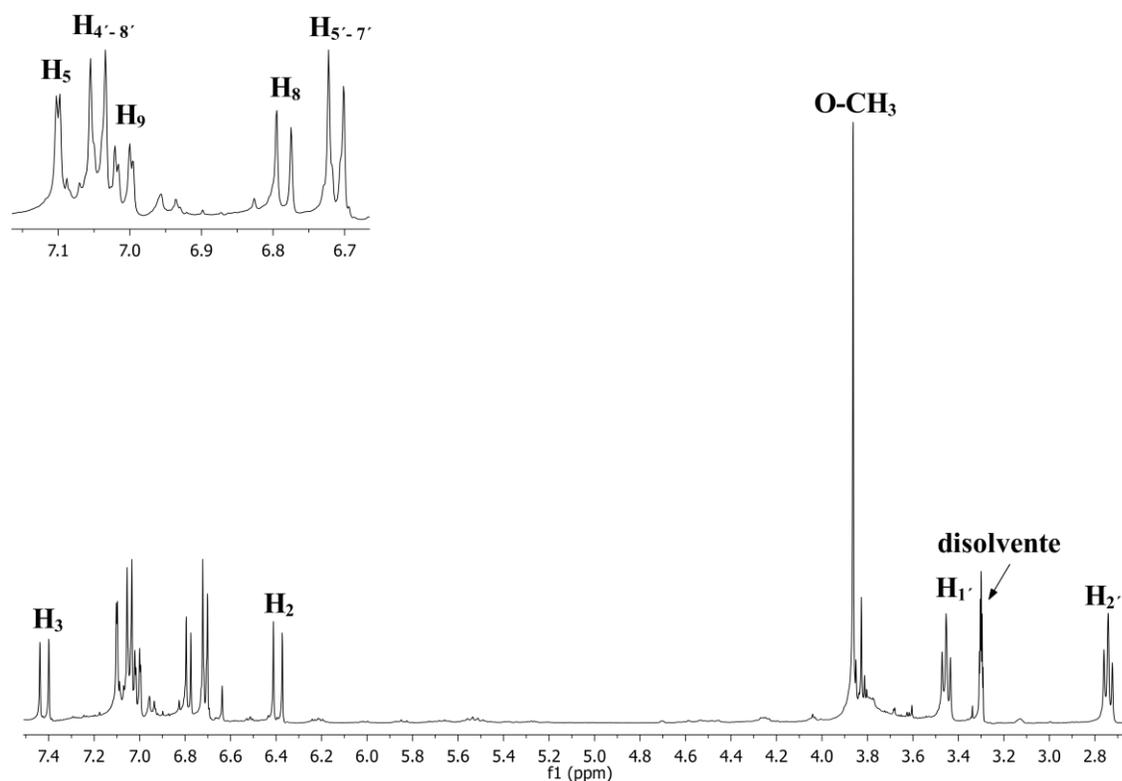


Figura 40. Espectro de RMN- ^1H en MeOD a 400 MHz de (*E*)-*N*-feruloil tiramina (**X**) presente en la fracción 39 de la raíz de *A. cuspidata*.

Mediante el experimento HMBC se observó que los protones H₅ y H₈ se correlacionaron con el C₆ ubicado en δ_C 149.2 a dos y tres enlaces cada uno. Así mismo, se detectó la unión de un grupo metoxilo en este anillo aromático, en δ_H 3.86 (δ_C 56.4) por la correlación a tres enlaces con el C₆. Por su parte H₉ se correlacionó con un carbono cuaternario en δ_C 149.7 (C₇) que tiene unido un grupo OH. Mientras que H₈ mostró correlación a tres enlaces con el C₄ (δ_C 128.3), Figura 41.

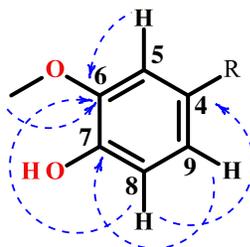


Figura 41. Correlaciones de HMBC del sistema ABX de X. R: parte restante de la molécula por elucidar.

Mediante el experimento HMBC se observó la conectividad de una amida α , β -insaturada en esta estructura, Figura 42. Brevemente, H₅ se correlacionó a tres enlaces con el C₃ (δ_C 142.0) y mediante las correlaciones ¹H-¹H-COSY se observó un sistema AB en δ_H 7.42 (1H, d, $J = 15.7$ Hz) y δ_H 6.39 (1H, d, $J = 15.7$ Hz) asignados a H₃ y H₂ respectivamente. Por su constante de acoplamiento, estos protones vinílicos presentaron configuración *E*, y en el experimento HMBC, se observó la conectividad de estos protones a un carbonilo de amida en δ_C 169.2 que se asignó al C₁.

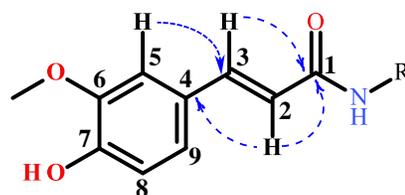


Figura 42. Correlaciones de HMBC del sistema amida α , β -insaturado de X. R: parte restante de la molécula en elucidación.

Continuando con la elucidación, la parte restante de la molécula se identificó por la conectividad observada del H₁' δ_H 3.45 (2H, t, $J = 7.4$ Hz) con el carbonilo (C₁) mediante HMBC, mismo que mostró acoplamiento con H₂' δ_H 2.74 (2H, t, $J = 7.3$ Hz) y también se correlacionó con un anillo aromático *p*-sustituido. Dichos protones del anillo de benceno se observaron en δ_H 7.04 (2H, d, $J = 8.4$ Hz) y δ_H 6.71 (2H, d, $J = 8.4$ Hz) asignadas H₈,

H_{4'} y H_{7'}, H_{5'}, respectivamente, con acoplamiento *orto* y por sus constantes de acoplamiento se estableció sistema AA'BB', también en el HSQC, se observó que estos protones están directamente unidos a los carbonos en δ_c 130.7 y δ_c 116.2, respectivamente. Basándonos en los datos anteriores y comparando los datos espectrales ya reportados, el compuesto **X** se identificó como (*E*)-*N*-feruloil tiramina, Figura 43.

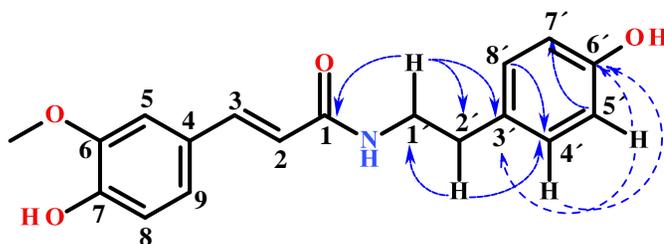


Figura 43. Correlaciones claves de HMBC de **X**.

A continuación se muestra el espectro DEPTQ Figura 44, con las asignaciones del compuesto **X**, y en los apéndices 1-h-j el resto de sus experimentos.

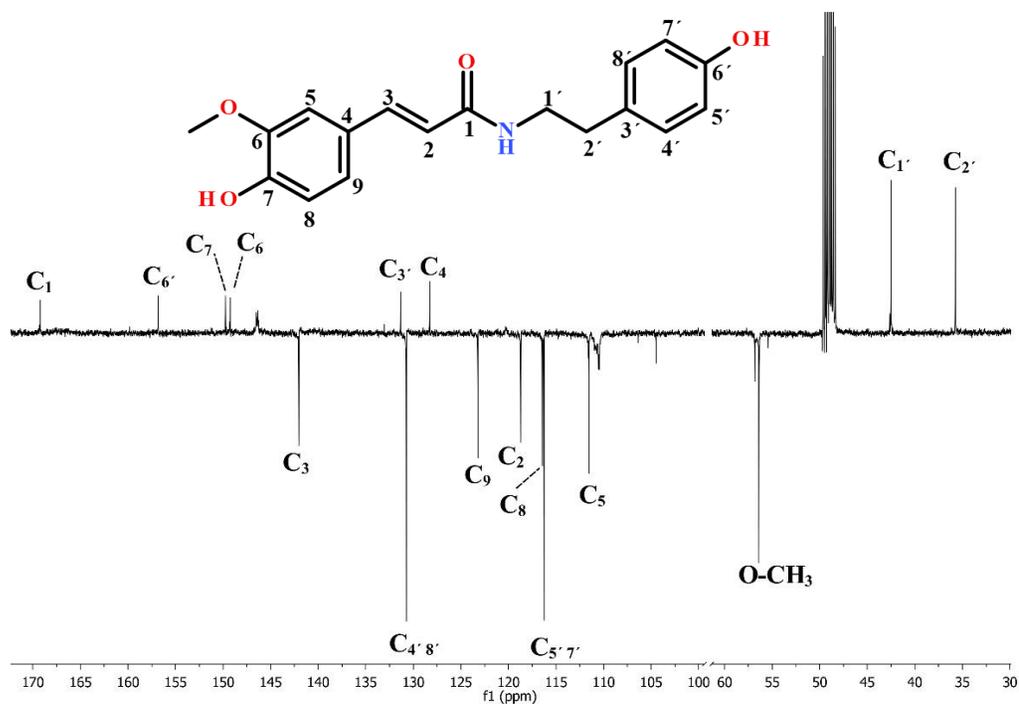


Figura 44. Espectro de DEPTQ en MeOD a 100 MHz de ((*E*)-*N*-feruloil tiramina) **X** presente en la fracción 39 de la raíz de *A. cuspidata*.

(*E*)-*N*-feruloil tiramina, es un compuesto de naturaleza fenólica, resultado de la unión del ácido ferúlico con tiramina mediante un enlace de tipo amida. Se considera una fitoalexina, puesto que juega un papel fundamental en la defensa contra patógenos y en la respuesta a heridas en plantas (Sun *et al.*, 2019).

Estudios previos han señalado la importancia de **X**, ya que posee una amplia gama de actividades farmacológicas, como: hipoglucémica (Amaro *et al.*, 2014) inhibidor de la melanogénesis en células de melanoma de ratón (Efdi *et al.*, 2007); Thangnipon *et al.* (2012) consideran que el efecto protector de **X** contra la muerte neuronal inducida por A β ₁₋₄₂ podría deberse a su propiedad antioxidante y antiinflamatoria (Jiang *et al.*, 2015). Gao *et al.* (2019) sugieren que **X** podría ser candidato prometedor en la terapia contra el cáncer, puesto que inhibió el crecimiento de células HepG2 y no presenta toxicidad con IC₅₀ de 194 \pm 0.894 μ M. Cabe señalar que hasta el momento (*E*)-*N*-feruloil tiramina, no ha sido reportado dentro del género *Acalypha*. Los desplazamientos de todos los protones y átomos de carbono del compuesto **X**, se resumen en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Datos espectroscópicos de RMN-¹H [δ en ppm, multiplicidad, (*J* en Hz)] y ¹³C (400 y 100 MHz, respectivamente) de (*E*)-*N*-feruloil tiramina (**X**) en CD₃OD.

Posición	δ_H	δ_C	HSQC	HMBC _{H-C}	COSY	DEPTQ
1	-	169.2	-	-	-	C
2	6.39, d, (<i>J</i> = 15.7)	118.7	118.7	128.2, 169.2	7.42	CH
3	7.42, d, (<i>J</i> = 15.7)	142.0	142.0	111.5, 123.2, 169.2	6.39	CH
4	-	128.2	-	-	-	C
5	7.10, d, (<i>J</i> = 1.8)	111.5	111.5	123.2, 142.0, 149.2	-	CH
6	-	149.2	-	-	-	C
7	-	149.7	-	-	-	C
8	6.78, d, (<i>J</i> = 8.1)	116.4	116.4	128.2, 149.2	7.01	CH
9	7.01, dd, (<i>J</i> = 8.2, 1.8)	123.2	123.2	111.5, 142.0, 149.7	6.78	CH
O-CH ₃	3.86, s	56.4	56.4	149.2	-	CH ₃
1'	3.45, t, (<i>J</i> = 7.4)	42.5	42.5	35.7, 131.3, 169.2	2.74	CH ₂
2'	2.74, t, (<i>J</i> = 7.3)	35.7	35.7	42.5, 130.7	3.45	CH ₂
3'	-	131.3	131.3	-	-	C

Cuadro 10. (Continuación)

Posición	δ_H	δ_C	HSQC	HMBC _{H-C}	COSY	DEPTQ
4'	7.04, d, ($J = 8.4$)	130.7	130.7	35.74, 130.7, 156.80	-	CH
5'	6.78, d, ($J = 8.1$)	116.3	116.4	116.3, 131.3, 156.8	7.04	CH
6'	-	156.8	156.8	-	-	C
7'	6.78, d, ($J = 8.1$)	116.3	116.4	116.3, 131.3, 156.8	7.04	CH
8'	7.04, d, ($J = 8.4$)	130.7	130.7	35.74, 130.7, 156.80	-	CH

Multiplicidad: s = simple, t = triple, d = doble, dd = doble de dobles

En el Apéndice 1-k, se muestran imágenes de algunos de los compuestos y mezclas obtenidas, de los órganos de *A. cuspidata*.

4.3 Evaluación de la actividad antitopoisomerasa

Es crucial hallar MS con actividad antitopoisomerasa, ya que afectan la acción de las TOP (I y/o II) produciendo rupturas permanentes en el ADN, en consecuencia, provocan la muerte celular, razón de su empleo como agentes anticancerígenos. Además, que existe la posibilidad que las moléculas encontradas sean inhibidores más potentes que los compuestos ya reportados, mismos que pueden disminuir los efectos secundarios negativos que se observan *in vivo*, y por último pueden ser moléculas más estables.

Debido a la poca cantidad obtenida de algunos compuestos, a la mezcla con ftalatos y la actividad previamente reportada, sólo se evaluaron los siguientes metabolitos para la actividad antitopoisomerasa:

De los compuestos encontrados en hojas-flores (**A**), la mezcla de ácidos grasos libres y ésteres metálicos de ácidos grasos insaturados (**IIa** y **IIb**) se encontraron en mayor cantidad, por lo tanto, fueron los que se evaluaron, también el 3-*O*- β -D-glucopiranosido del β -sitosterol (**V**) ya que no existen reportes, contrario al metil carboxilato de

brevifolina (**I**) donde Tomczyk *et al.* (2008) señalan la citotoxicidad contra la línea celular de carcinoma de mama humano (MCF-7) IC_{50} : $1.11 \pm 2 \mu\text{M}$ y su capacidad de unión al ADN, mediante el ensayo de inhibición de la topoisomerasa I y II del ADN.

Así mismo en tallo (**B**), se encontraron mezclas de ácidos grasos insaturados con ésteres metílicos de ácidos grasos, entre otros compuestos conocidos como el estigmasterol y el β -sitosterol, en consecuencia, ya no fue necesario realizar su evaluación.

Por último, en raíz (**C**) se volvió a encontrar la mezcla de ácidos grasos libres insaturados y ésteres metílicos de ácidos grasos en mezcla con ftalatos, por lo que, únicamente se evaluó a (*E*)-*N*-feruloil tiramina (**X**) y no al compuesto **IX**, ya que no se purificó la cantidad suficiente, para hacer la prueba.

Para determinar si los compuestos **IIa**, **IIb**, **V** y **X** presentaban actividad antitopoisomerasa, fueron evaluados contra dos cepas mutadas de *Saccharomyces cerevisiae* JN394 y JN362a (descritas en la sección 2.5.1). La cepa de *S. cerevisiae* JN394 tiene su pared celular modificada para admitir el acceso de diversos compuestos, además presenta deficiencia en los mecanismos de reparación del ADN dañado, debido a la carencia del gen rad52, (Nitiss y Wang, 1988), en consecuencia, estas alteraciones incrementan la sensibilidad ante compuestos con posible actividad antitopoisomerasa. En cambio, la cepa *S. cerevisiae* JN362a, tiene su genotipo sin mutaciones, por lo tanto, es resistente a los compuestos que dañen el material genético (Gunatilaka *et al.*, 1994; Nitiss y Wang, 1988). Con base a lo anterior, los compuestos con actividad antitopoisomerasa inhiben el crecimiento de JN394 pero no afectan el crecimiento de JN362a.

Como se observa en el Cuadro 11, CPT y ETP afectaron el crecimiento de la cepa JN394, inhibiéndola un 100.0 ± 0.0 y 78.27 ± 1.53 % respectivamente. En cambio, no interfirieron en el crecimiento de JN362a (99.51 ± 2.12 y 100.63 ± 2.13 %).

En cuanto a los compuestos aislados de *A. cuspidata* se observó que **IIa** y **IIb** tienen actividad antitopoisomerasa, ya que inhibieron el crecimiento de la cepa JN394 en un 47.7 ± 1.54 y 45.3 ± 2.07 %, respectivamente, y no afectaron el crecimiento de la cepa JN362a (130.34 ± 2.08 y 89.67 ± 1.36 %). En cambio los compuestos **V** y **X**, no presentaron dicha actividad, dado que el crecimiento de la cepa JN394 no se vio afectado siendo estadísticamente igual que el control negativo con 99.81 ± 1.97 y 99.82 ± 2.73 % de crecimiento.

Por esta razón, no se probaron contra JN362a, ya que pueden tener un mecanismo de acción diferente a la inhibición de las topoisomerasas.

Cuadro 11. Porcentaje de crecimiento* de las cepas JN394 y JN362a en presencia de los controles y compuestos aislados de *A. cuspidata*.

Controles y Compuestos	Concentración (mg/mL)	JN394**	JN362a**
DMSO		100.00 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00 ^{ab}
CPT (TOP I)	1	0.00 ± 0.00 ^d	99.51 ± 2.12 ^{ab}
ETP (TOP II)	2	21.73 ± 1.53 ^c	100.63 ± 2.13 ^{ab}
IIa	12.5	52.28 ± 1.54 ^b	130.34 ± 2.08 ^a
IIb	12.5	54.71 ± 2.07 ^b	89.67 ± 1.36 ^c
V	11.5	99.81 ± 1.97 ^a	ND
X	6	99.82 ± 2.73 ^a	ND

*DMSO control negativo (100 % de crecimiento) ** Los valores son la media ± D.E. del experimento por duplicado. Medias con la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes. ND: no determinado.

Los resultados del presente estudio, indicaron que, las mezclas de ácidos grasos libres así como, los ésteres metílicos de ácidos grasos insaturados y triglicéridos son, en parte los responsables de la actividad antitopoisomerasa reportada en *A. cuspidata*.

Nakahara (1922; 1924) reportó por primera vez la actividad anticancerígena de algunos ácidos grasos. Estudios *in vitro* (Begin *et al.*, 1985; 1986; Dippenaar *et al.*, 1982) y pocas investigaciones *in vivo* (Booyens *et al.*, 1984; Kenny *et al.*, 2000), reportan la eficacia y la selectividad de la destrucción hacia células de cáncer en comparación con las células normales que tienen ciertos ácidos grasos poliinsaturados. También, se ha reportado actividad antitumoral de ácidos grasos insaturados aislados de *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) (Yu *et al.*, 2008). De esa misma especie, se han aislados ésteres metílicos de ácidos grasos, los cuales se consideran agentes quimiopreventivos y quimioterapéuticos contra el cáncer, puesto que causaron apoptosis e inhibición en células de cáncer gástrico humano (SGC-7901). No obstante, los mecanismos de la actividad antitumoral inducida por ésteres metílicos, aún no se comprende en su totalidad, sin embargo, por su bajo peso molecular pueden tener capacidad para penetrar el núcleo

celular y actuar sobre objetivos celulares (Yu *et al.*, 2005), como las topoisomerasas, que permanecen inaccesibles para compuestos de peso molecular más grandes (Bittoun *et al.*, 1999).

Los ácidos grasos Z-insaturado (c-UFAs) parecen provocar su acción citotóxica por su capacidad para aumentar los radicales libres, en consecuencia generan daño a la membrana celular y al ADN (Padma y Das 1996; Kumar y Das 1995). El ácido 14-metilhexadecanoico y otro ácido graso con un resto de ciclopropano a una concentración de 0.1 mg/mL, mostraron una inhibición significativa contra la TOP I, comparable a la de la camptotecina de 0.2 mg/mL (Lee *et al.*, 1998) así mismo, estos autores reportan que la insaturación y la ramificación de los ácidos grasos están estrechamente relacionadas con su actividad contra TOP I. Considerando lo anterior, los ácidos grasos libres así como los ésteres metílicos de ácidos grasos insaturados y triacilglicerolos presentes en *A. cuspidata* con actividad antitopoisomerasa, pueden tener potencial como agentes contra el cáncer, por lo que es necesarios seguir con la purificación y caracterización de estos compuestos.

Capítulo 5. CONCLUSIONES

- 1) Del estudio químico realizado en los diferentes órganos de *Acalypha cuspidata* se aislaron:
 - De hojas-flores (**A**): metil carboxilato de brevifolina (**I**), las mezclas de ácidos grasos libres, así como los ésteres metílicos de ácidos grasos insaturados y triacilgliceroles (**IIa** y **IIb**), mezcla de ftalatos con ácidos grasos (**III**), derivado del ácido elágico (**IVa**), ácido 3,4-dihidroxibenzoico en mezcla con carbohidratos (**IVb**), y 3-*O*- β -D-glucopiranosido del β -sitosterol (**V**).
 - De los tallos (**B**): mezcla de carotenos, ácidos grasos insaturados, ésteres metílicos de ácidos grasos y triacilgliceroles (**VI**), estigmasterol (**VII**) y β -sitosterol (**VIII**).
 - De raíces (**C**): 4-*O*- β -D-glucopiranosido del ácido 3,3'-dimetil-elágico (**IX**) y (*E*)-*N*-feruloil tiramina (**X**).
- 2) De los compuestos evaluados biológicamente, las mezclas de ácidos grasos libres, así como los ésteres metílicos de ácidos grasos insaturados y triacilgliceroles son, en parte, los responsables de la actividad antitopoisomerasa reportada en *A. cuspidata*.
- 3) El compuesto 4-*O*- β -D-glucopiranosido del ácido 3,3'-dimetil-elágico (**IX**), se reporta por primera vez en la familia Euphorbiaceae.
- 4) Los compuestos 3-*O*- β -D-glucopiranosido del β -sitosterol (**V**) y (*E*)-*N*-feruloiltiramina (**X**) se reportan por primera vez en el género *Acalypha*.
- 5) Al realizar la separación de los compuestos orgánicos presentes en tallo (extracto con señales de compuestos de interés) se identificaron esteroides, carotenos, triacilgliceroles, mezclas de ácidos grasos libres insaturados y ésteres metílicos de ácidos grasos. Por lo que, se atribuye que los compuestos activos en *A. cuspidata*, son compuestos principalmente medianamente polares.

Capítulo 6. REFERENCIAS

- Abraham, R.J., Rowan, A.E. 1991. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Chlorophyll, en H. Scheer (Ed.) Chlorophylls, CRC Press, 797-834
- Agostini-Costa, T. da S., Vieira, R.F., Bizzo, H.R., Silveira, D., Gimenes, M.A. 2012. Secondary Metabolites. Chromatography and its Applications, Dr. Sasikumar Dhanarasu (Ed.), ISBN: 978-953-51-0357-8
- Amakura, Y., Miyake, M., Ito, H., Murakaku, S., Araki, S., Itoh, Yoshida, T. 1999. Acalyphidins M1, M2 and D1, ellagitannins from *Acalypha hispida*. *Phytochemistry*, 50, 667-675
- Amaro, C., González-Cortazar, M., Herrera-Ruiz, M., Román-Ramos, R., Aguilar-Santamaría, L., Tortoriello, J., Jiménez-Ferrer, E. 2014. Hypoglycemic and hypotensive activity of a root extract of *Smilax aristolochiifolia*, standardized on *N*-trans-feruloyl-tyramine. *Molecules*, 11366-11384
- Andrews, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5-16
- Astudillo, A., Hong, E., Bye, R., Navarrete, A. 2004. Antispasmodic activity of extracts and compounds of *Acalypha phleoides* Cav. *Phytotherapy Research*, 18, 102-106
- Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V.M., Stuppner, H. 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33, 1582-1614
- Awanchiri, S.S., Trinh-Van-Dufat, H., Shirri, J.C., Dongfack, M.D.J., Nguenang, G.M., Boutefnouchet, S., Fomum, Z.T., Seguin, E., Verite, P., Tillequin, F., Wandji, J. 2009. Triterpenoids with antimicrobial activity from *Drypetes inaequalis*. *Phytochemistry*, 70, 419-423
- Baloch, I.B., Baloch, M.K., Najam us Saqib, Q. 2005. Tumor-Promoting diterpene esters from latex of *Euphorbia cauducifolia* L. *Helvetica Chimica Acta*, 88, 3145-3150
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493
- Begin, M.E., Das, U. N., Ells, G., Horrobin, D.F. 1985. Selective killing of human cancer cells by polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine*, 19, 177-186
- Bégin, M.E., Ells, G., Das, U.N., Horrobin, D. F. 1986. Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Journal of the National Cancer Institute*, 77, 1053-1062

- Bittoun, P., Avramoglou, T., Vassy, J., Crépin, M., Chaubet, F., Fermandjian, S. 1999. Low-molecular-weight dextran derivatives (f-CMDB) enter the nucleus and are better cell-growth inhibitors compared with parent CMDB polymers. *Carbohydrate research*, 322, 247-255
- Booyens, J., Engelbrecht, P., Le Roux, S., Louwrens, C.C., Van der Merwe, C.F., Katzeff, I.E. 1984. Some effects of the essential fatty acids linoleic acid and alpha-linolenic acid and of their metabolites gamma-linolenic acid, arachidonic acid, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and of prostaglandins A1 and E1 on the proliferation of human osteogenic sarcoma cells in culture. *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine*, 15, 15-33
- Bork, P.M., Schmitz, M.L., Kuhnt, M., Escher, C., Heinrich, M. 1997. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF- κ B. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 402, 85-90
- Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., Massolini, G. 2014. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 218-228
- Bucar, F., Wube, A., Schmid, M. 2013. Natural product isolation how to get from biological material to pure compounds. *Natural Product Reports*, 30, 525-545
- Butnariu, M. 2016. Methods of analysis (extraction, separation, identification and quantification) of carotenoids from natural products. *Journal of Ecosystem & Ecography*, 6, doi:10.4172/2157-7625.1000193
- Calzada, F., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Contreras, A., Mata, R. 1998. Screening of Mexican medicinal plants for antiprotozoal activity. *Pharmaceutical biology*, 36, 305-309
- Camacho-Luis, A., Gayosso-De-Lucio, J.A., Torres-Valencia, J.M., Muñoz-Sánchez, J.L., Alarcón-Hernández, E., López, R., Barrón, B.L. 2008. Antioxidant constituents of *Geranium bellum* Rose. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 2, 103-107
- Canales, M., Hernández, T., Rodríguez-Monroy, M.A., Flores, C.M., Jiménez-Estrada, M., Hernández, L.B., Durán, A., Hernández-Moreno, M., Trejo, N.A., Hernández, A.B., Ramirez, J.J., Orozco, J., Eleno, M.G., Martínez, K.E. 2011. Evaluation of the antimicrobial activity of *Acalypha monostachya* Cav. (Euphorbiales: Euphorbiaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5, 640-647
- Correal Castellanos, E., Pascual Villalobos, M. J. 1992. La familia Euphorbiaceae como fuente de aceites vegetales para la industria tecnoquímica. *Grasas y aceites*, 43, 39-44
- Cragg, G.M., Newman, D.J. 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica Biophysica Acta-General Subjects*, 1830, 3670-3695

- Dewick, P.M. 2009. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach, 3rd Edition. ISBN: 978-0-470-74168-9
- Dippenaar, N., Booyens, J., Fabbri, D., Katzeff, I. E. 1982. The reversibility of cancer: evidence that malignancy in melanoma cells is gamma-linolenic acid deficiency-dependent. South African medical journal, 62, 505-509
- Efdi, M., Ohguchi, K., Akao, Y., Nozawa, Y., Koketsu, M., Ishihara, H. 2007. *N-trans-feruloyltyramine* as a melanin biosynthesis inhibitor. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 1972-1974
- Faizi, S., Ali, M., Saleem, R., Bibi, S. 2001. Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of stigma-5-en-3-*O*- β -glucoside and its acetyl derivative. Magnetic Resonance in Chemistry, 39, 399-405
- Falodun, A., Ali, S., Quadir, I.M., Choudhary, I.M. 2008. Phytochemical and biological investigation of chloroform and ethylacetate fractions of *Euphorbia heterophylla* leaf (Euphorbiaceae). Journal of Medicinal Plants Research, 2, 365-369
- Fawzy, G.A., Al-Taweel, A.M., Perveen, S., Khan, S.I., Al-Omary, F.A. 2017. Bioactivity and chemical characterization of *Acalypha fruticosa* Forssk. Growing in Saudi Arabia. Saudi Pharmaceutical Journal, 25, 104-109
- Gao, X., Wang, C., Chen, Z., Chen, Y., Santhanam, R. K., Xue, Z., Chen, H. 2019. Effects of *N-trans-feruloyltyramine* isolated from laba garlic on antioxidant, cytotoxic activities and H_2O_2 -induced oxidative damage in HepG2 and L02 cells. Food and Chemical Toxicology, 130-141
- Goel, G., Makkar, H.P., Francis, G., Becker, K. 2007. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. International Journal of Toxicology, 26, 279-288
- Guillén, M.D., Ruiz, A. 2003. ^1H Nuclear Magnetic Resonance as a fast tool for determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures. European Journal of Lipid Science and Technology, 105, 502-507
- Guillén, M.D., Ruiz, A. 2003. Edible oils: discrimination by ^1H nuclear magnetic resonance. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83, 338-346
- Gunatilaka, A.A.L., Kingston D.G.I., Johnson, R.K. 1994. Mechanism-based isolation and structures of some anticancer active natural products. Pure and Applied Chemistry, 66, 2219-2222
- Harvey, D. 2000. Modern Analytical Chemistry. McGraw-Hill Higher Education. USA. ISBN 0-07-237547-7
- Herrera-Martínez, M. 2010. Actividad biológica de especies vegetales del estado de Oaxaca: *Sicyos bulbosus* (Cucurbitaceae), *Encyclia michuacana* (Orchidaceae) y *Acalypha cuspidata* (Euphorbiaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad del Mar, Oaxaca, México
- Herrera-Martínez, M. 2016. Evaluación de la actividad anti-amibiana y anti-cáncer de *Adenophyllum aurantium* y *Acalypha cuspidata*. Tesis doctoral. Centro de

Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México, Ciudad de México

- Huang, Y.L., Chen, C.C., Hsu, F.L., Chen, C.F. 1998. Tannins, Flavonol Sulfonates, and a Norlignan from *Phyllanthus virgatus*. *Journal of Natural Products*, 61, 1194-1197
- Ikewuchi, J.C., Onyeike, E.N., Uwakwe, A.A., Ikewuchi, C.C. 2011. Effect of aqueous extract of the leaves of *Acalypha wilkesiana* 'Godseffiana' Muell Arg (Euphorbiaceae) on the hematology, plasma biochemistry and ocular indices of oxidative stress in alloxan induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 1415-1424
- Iniaghe, O.M., Malomo, S.O., Adebayo, J.O. 2009. Proximate composition and phytochemical constituents of leaves of some *Acalypha* species. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8, 256-258
- Jensen, L.H., Nitiss, K.C., Rose, A., Dong, J., Zhou, J., Hu, T., Osheroff, N., Jensen, P.B., Sehested, M., Nitiss, J.L. 2000. A novel mechanism of cell killing by anti-topoisomerase II bisdioxopiperazines. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 2137-2146
- Jiang, Y., Yu, L., Wang, M. H. 2015. N-*trans*-feruloyltyramine inhibits LPS-induced NO and PGE₂ production in RAW 264.7 macrophages: Involvement of AP-1 and MAP kinase signalling pathways. *Chemico-biological interactions*, 235, 56-62
- Kassem, M.E., Hashim, A.N., Hassanein, H.M. 2013. Bioactivity of *Antidesm abunius* leaves (Euphorbiaceae) and their major phenolic constituents. *European Scientific Journal*, 9, ISSN 1857- 7431
- Kenny, F. S., Pinder, S. E., Ellis, I. O., Gee, J. M., Nicholson, R. I., Bryce, R. P., Robertson, J. F. 2000. Gamma linolenic acid with tamoxifen as primary therapy in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 85, 643-648
- Kirby, J., Nishimoto, M., Park, J.G., Withers, S.T., Nowroozi, F., Behrendt, D., Garcia, E., Fortman, J.I., Johnson, H.E., Anderson, J.V., Keasling, J.D. 2010. Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, 71, 1466-1473
- Kumar, G. S., Das, U.N. 1995. Free radical-dependent suppression of growth of mouse myeloma cells by α -linolenic and eicosapentaenoic acids in vitro. *Cancer letters*, 92, 27-38
- Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., Maestri, D. 2008. Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica. Encuentro Grupo Editor, Córdoba. ISBN: 978-987-1432-09-7
- Lee, D. S., Hong, S.D. 1996. Inhibition mode of DNA topoisomerase by dibutyl phthalate. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6, 366-367

- Lee, H. K., Lee, D.S., Lim, J., Kim, J. S., Im, K. S., Jung, J. H. 1998. Topoisomerase I inhibitors from the *Streptomyces sp.* strain KM86-9B isolated from a marine sponge. Archives of pharmacal research, 21, 729-733
- Li, X.C., Elsohly, H.N., Hufford, C.D, Clark, A.M. 1999. NMR assignments of ellagic acid derivatives. Magnetic Resonance in Chemistry, 11, 856-859
- Lim, S.W., Ting, K.N., Bradshaw, T.D., Zeenathul, N.A., Wiart, C., Khoo, T.J., Loh, H. S. 2011. *Acalypha wilkesiana* extracts induce apoptosis by causing single strand and double strand DNA breaks. Journal of Ethnopharmacology, 138, 616-623
- Lira-De León, K.I., Herrera-Martínez, M., Ramirez-Mares, M.V., Hernández-Carlos, B. 2017. Evaluation of anticancer potential of eight vegetal species from the state of Oaxaca. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 14, 61-73
- Liu, Y., Mumrakami, N., Ji, H., Abreu, P., Zhang, S. 2007. Antimalarial flavonol glycosides from *Euphorbia hirta*. Pharmaceutical Biology, 45, 278-281
- Macías, K.L., Juárez, B.I., Cárdenas, N.C., Aguirre, J.R., Jasso, Y. 2009. Evaluación de plantas tradicionalmente utilizadas en la desinfección de heridas. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 40, 5-10
- Marrez, D.A., El Raey, M. A., El-Hagrassi, A.M., Seif, M.M., Ragab, T.I., El Negoumy, S.I., Emam, M. 2017. Phenolic profile and antimicrobial activity of green synthesized *Acalypha wilkesiana* seed's silver nanoparticles against some food borne pathogens. Bioscience Research, 14, 817-830
- Miglietta, M.L., Lamanna, R. 2006. ¹H HR-MAS NMR of carotenoids in aqueous samples and raw vegetables. Magnetic Resonance in Chemistry, 44, 675-685
- Moawad, A., Hassan, H., Amin, E. 2016. Biologically-Guided Isolation Of Leishmanicidal Secondary Metabolites From *Euphorbia peplus* L. Planta Medica, 82, PC47
- Monsalve-Abaca, F. 2012. Avances en los Mecanismos Moleculares del Cáncer. Revista Médica de Maule 28, 40-55
- Mosquera, O.M., Correa, Y.M., Buitrago, D.C., Niño, J. 2007. Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 102, 631-634
- Mwine, J.T., Van Damme, P. 2011. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. Journal of Medicinal Plants Research, 5, 652-662
- Nakahara, W. 1922. Studies on lymphoid activity: VI. Immunity to transplanted cancer induced by injection of olive oil. Journal of Experimental Medicine, 35, 493-505
- Nakahara, W. 1924. Effect of fatty acids on the resistance of mice to transplanted cancer. Journal of Experimental Medicine, 40, 363-373

- Nitiss, J.L., Wang, J.C. 1988. DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 7501-750
- Okuda Takuo, Mori Kazuko, Hatano Tsutomu. The distribution of geraniin and mallotusinic acid in the order geraniales. 1980. *Phytochemistry*. 19, 547-551
- Padma, M., Das, U. N. 1996. Effect of *cis*-unsaturated fatty acids on cellular oxidant stress in macrophage tumor (AK-5) cells *in vitro*. *Cancer letters*, 109, 63-75
- Park, W. Y., Lee, S. C., Ahn, B. T., Lee, S. H., Ro, J. S., Lee, K. S. 1993. Phenolic Compounds from *Acalypha australis* L. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 24, 20-25
- Payo Hill, A., Dominicis, M.E., Mayor, J., Oquendo, M., Sarduy, R. 2001. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del género *Croton* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 35, 203-206
- Peng, B., Chang, Q., Wang, L., Hu, Q., Wang, Y., Tang, J., Liu, X. 2008. Suppression of human ovarian SKOV-3 cancer cell growth by *Duchesnea* phenolic fraction is associated with cell cycle arrest and apoptosis. *Gynecologic oncology*, 108, 173-181
- Peres, M.T., Delle Monache, F., Cruz, A.B., Pizzolatti, M.G., Yunes, R.A. 1997. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 56, 223-226
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., Marchand, C. 2010. DNA Topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & Biology*, 17, 421-433
- Pommier, Y., Pourquier, P., Fan, Y.I., Strumberg, D. 1998. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression*, 1400, 83-106
- Pretsch, E., Bühlmann, Badertscher, M. 2009. Structure determination of organic compounds (p. 108). Berlin: Springer-Verlag, DOI 10.1007/978-3-540-93810-1
- Rajamanikyam, M., Vadlapudi, V., Parvathaneni, S. P., Koude, D., Sripadi, P., Misra, S., Amanchy R., Upadhyayula, S. M. 2017. Isolation and characterization of phthalates from *Brevibacterium mcbrellneri* that cause cytotoxicity and cell cycle arrest. *Experimental and clinical science journal*, 16, 375
- Ramirez-Mares, M.V., Chandra, S., de Mejia, E.G. 2004. *In vitro* chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 554, 53-65
- Rashid, R., Hajam, G.N., Wani, M.H., Gulzar, A. 2017. Thin layer chromatography profiling of the medicinal plant *Solanum nigrum* L. from the local area of the district Anantnag of Jammu and Kashmir. *International Journal of Advanced Research, Ideas and Innovations in Technology*, 3, ISSN: 2454-132X

- Ravanelli, N., Santos, K.P., Motta, L.B., Lago, J.H.G., Furlan, C.M. 2016. Alkaloids from *Croton echinocarpus* Baill. Anti-HIV potential. South African Journal of Botany, 102, 153-156
- Rizk, A.F. M. 1987. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. Botanical Journal of the Linnean Society, 94, 293-326
- Rocha-Gracia, R.D.C., Arroyo, M.M.H., Zaráin, P.L., Carlos, B.H., Romero, H.S., Portugal, E.C., Perez, T.Z., López-Olguín, J.F. 2011. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican plants against methicillin-resistant *Staphylococcus*. African Journal of Biotechnology, 10, 13202-13218
- Ruan, H. L., Zhang, Y., Zhang, Y. H., Pi, H. F., Wu, J. Z. 2006. Studies on constituents from roots of *Euphorbia hylonoma*. China journal of Chinese materia medica, 31, 742-744
- Salah, M.A., Bedir, E., Toyang, N.J., Khan, I.A., Harries, M.D., Wedge, D.E. 2003. Antifungal clerodane diterpenes from *Macaranga monandra* (L) Muell. et Arg. (Euphorbiaceae). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 7607-7610
- Saleem, M., Nazir, M., Akhtar, N., Onocha, P.A., Riaz, N., Jabbar, A., Ali, M.S., Sultana, N. 2009. New phthalates from *Phyllanthus muellerianus* (Euphorbiaceae). Journal of Asian natural products research, 11, 974-977
- Sanz, J.M.C. 1994. Revisión taxonómica del género *Acalypha* L. (Euphorbiaceae) en Colombia. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas departamento de Biología vegetal, I. Tesis Doctoral. Madrid
- Satyajit, D., Sarker, Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.L. 2006. Natural products isolation. 2nd ed. Humana Press. Totowa, New Jersey. ISBN 1-59259-955-9
- Scott, K. N. 1970. NMR parameters of biologically important aromatic acids I. Benzoic acid and derivatives. Journal of Magnetic Resonance, 2, 361-376
- Scott, K. N. 1972. Carbon-13 nuclear magnetic resonance of biologically important aromatic acids. I. Chemical shifts of benzoic acid and derivatives. Journal of the American Chemical Society, 94, 8564-8568
- Seebaluck, R., Gurib-Fakim, A., Mahomoodally, F. 2015. Medicinal plants from the genus *Acalypha* (Euphorbiaceae) a review of their ethnopharmacology and phytochemistry. Journal of Ethnopharmacology, 159, 137-157
- Seebaluck-Sandoram, R., Lall, N., Fibrich, B., van Staden, A.B., Mahomoodally, F. 2018. Antibiotic-potentiating activity, phytochemical profile, and cytotoxicity of *Acalypha integrifolia* Willd. (Euphorbiaceae). Journal of Herbal Medicine, <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.03.005>
- Seo, D.J., Kim, K. Y., Park, R.D., Kim, D. H., Han, Y. S., Kim, T.H., Jung, W. J. 2013. Nematicidal activity of 3, 4-dihydroxybenzoic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Meloidogyne incognita*. Microbial pathogenesis, 59, 52-59

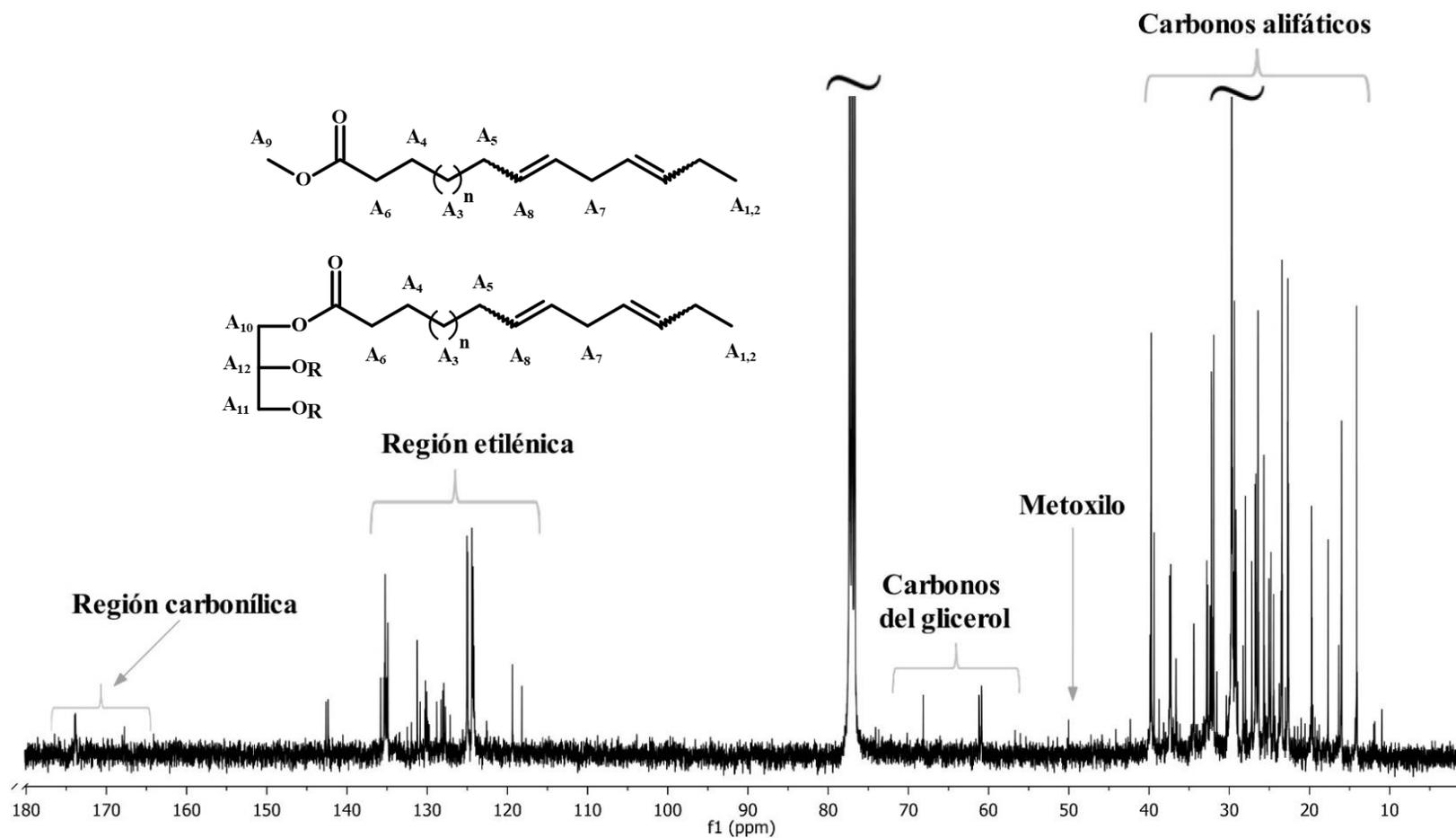
- Sobolev, A.P., Brosio, E., Gianferri, R., Segre, A. L. 2005. Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43, 625-638
- Sroka, Z., Cisowski, W. 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 753-758
- Sun, G., Strebl, M., Merz, M., Blamberg, R., Huang, F. C., McGraphery, K., Schwab, W. 2019. Glucosylation of the phytoalexin N-feruloyl tyramine modulates the levels of pathogen-responsive metabolites in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal* 100, 20-37
- Thangnipon, W., Suwanna, N., Kitiyanant, N., Soi-ampornkul, R., Tuchinda, P., Munyoo, B., Nobsathian, S. 2012. Protective role of *N*-trans-feruloyltyramine against β -amyloid peptide-induced neurotoxicity in rat cultured cortical neurons. *Neuroscience letters*, 229-232
- Toth-Soma, L. T., Gulyas, S., Szegletes, Z. 1993. Functional connection between intracellular and extracellular secretion in species of *Euphorbia* genus. *Acta biologica Hungarica*, 44, 433-443
- Ullmann, P., Ury, A., Rimmelé, P., Benveniste, P., Bouvier-Nave, P. 1993. UDP-glucose sterol β -d-glucosyltransferase, a plasma membrane-bound enzyme of plants: enzymatic properties and lipid dependence. *Biochimie*, 75, 713-723
- Verde-Star, M.J., García-González, S., Rivas-Morales, C. 2016. Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: Omnia Science. 1-40
- Verpoorte R. 2000. Pharmacognosy in the new millennium: Leadfinding and biotechnology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52, 253-262
- Villaseñor, J.L. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87, 559-902
- Ye, G., Peng, H., Fan, M., Huang, C. G. 2007. Ellagic acid derivatives from the stem bark of *Dipentodon sinicus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 125-127
- Yu, F. R., Lian, X. Z., Guo, H. Y., McGuire, P. M., Li, R. D., Wang, R., Yu, F. H. 2005. Isolation and characterization of methyl esters and derivatives from *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) and their inhibitory effects on the human SGC-7901 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8, 528-35
- Yu, F., Lu, S., Yu, F., Shi, J., McGuire, P. M., Wang, R. 2008. Cytotoxic activity of an octadecenoic acid extract from *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) on human tumour cell strains. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60, 253-259
- Yurkanis, B.P. 2008. *Química orgánica*. 5ª edición. Pearson Educación, México. ISBN: 978-970-26-0791-5

- Zhang, H., Guo, Z.J., Xu, W.M., You, X.J., Han, L., Han, Y.X., Dai, L.J. 2014. Antitumor effect and mechanism of an ellagic acid derivative on the HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line. *Oncology letters*, 7, 525-530
- Zhou, Z.H., Liu, M.Z., Wang, M.H., Qu, W., Sun, J.B., Liang, J.Y., Wu, F. H. 2015. A new ellagic acid derivative from *Polygonum runcinatum*. *Natural Product Research*, 29, 795-799
- Zhu, M., Dong, X., Guo, M. 2015. Phenolic profiling of *Duchesnea indica* combining macroporous resin chromatography (MRC) with HPLC-ESI-MS/MS and ESI-IT-MS. *Molecules*, 20, 22463-22475.

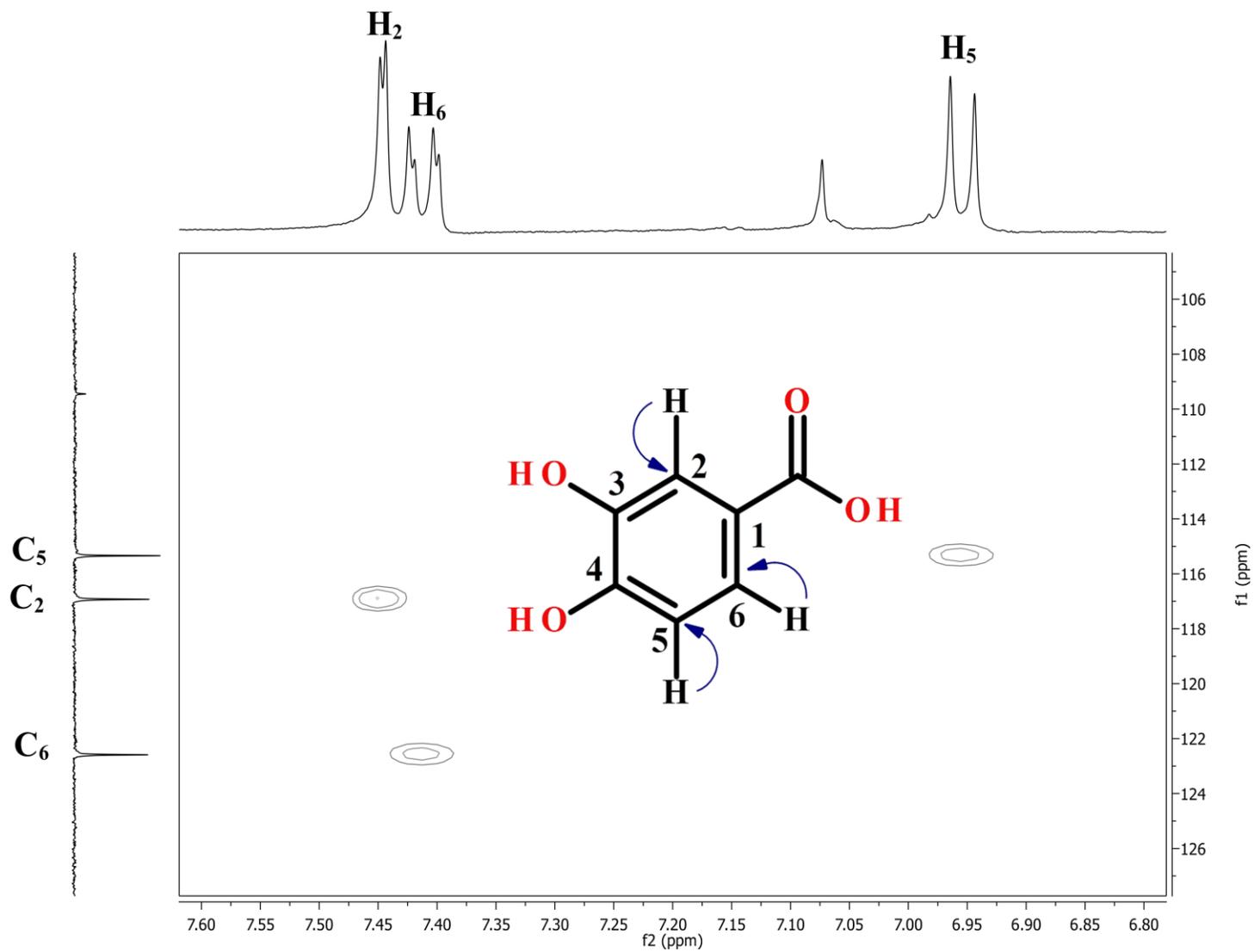
Capítulo 7. APÉNDICE

Apéndice 1. Experimentos de RMN 1D y 2D de los compuestos aislados en *A. cuspidata*.

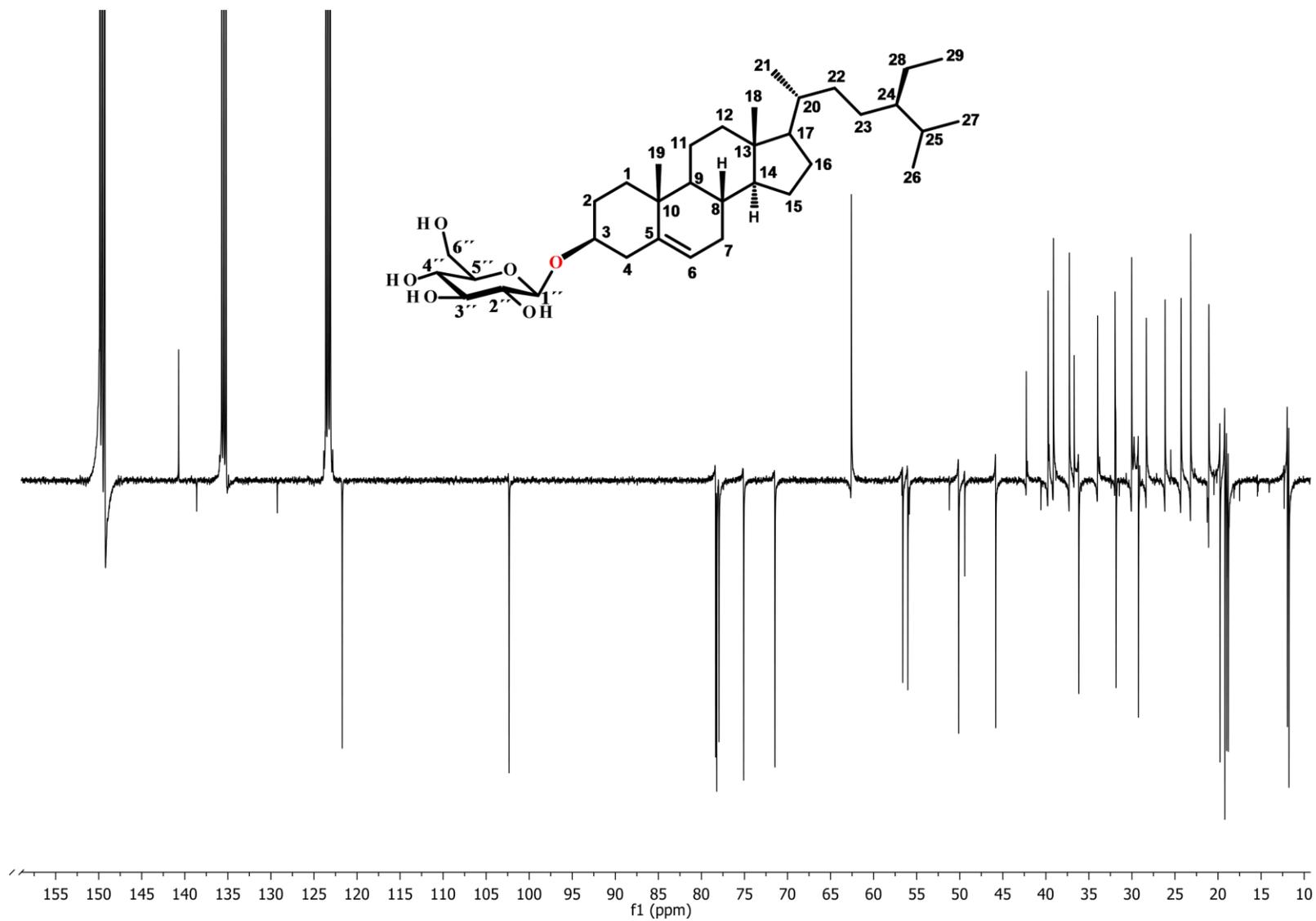
Apéndice 1-a. Espectro de RMN- ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de **IIb**. El símbolo virgulilla hace referencia a un corte en la parte superior del espectro



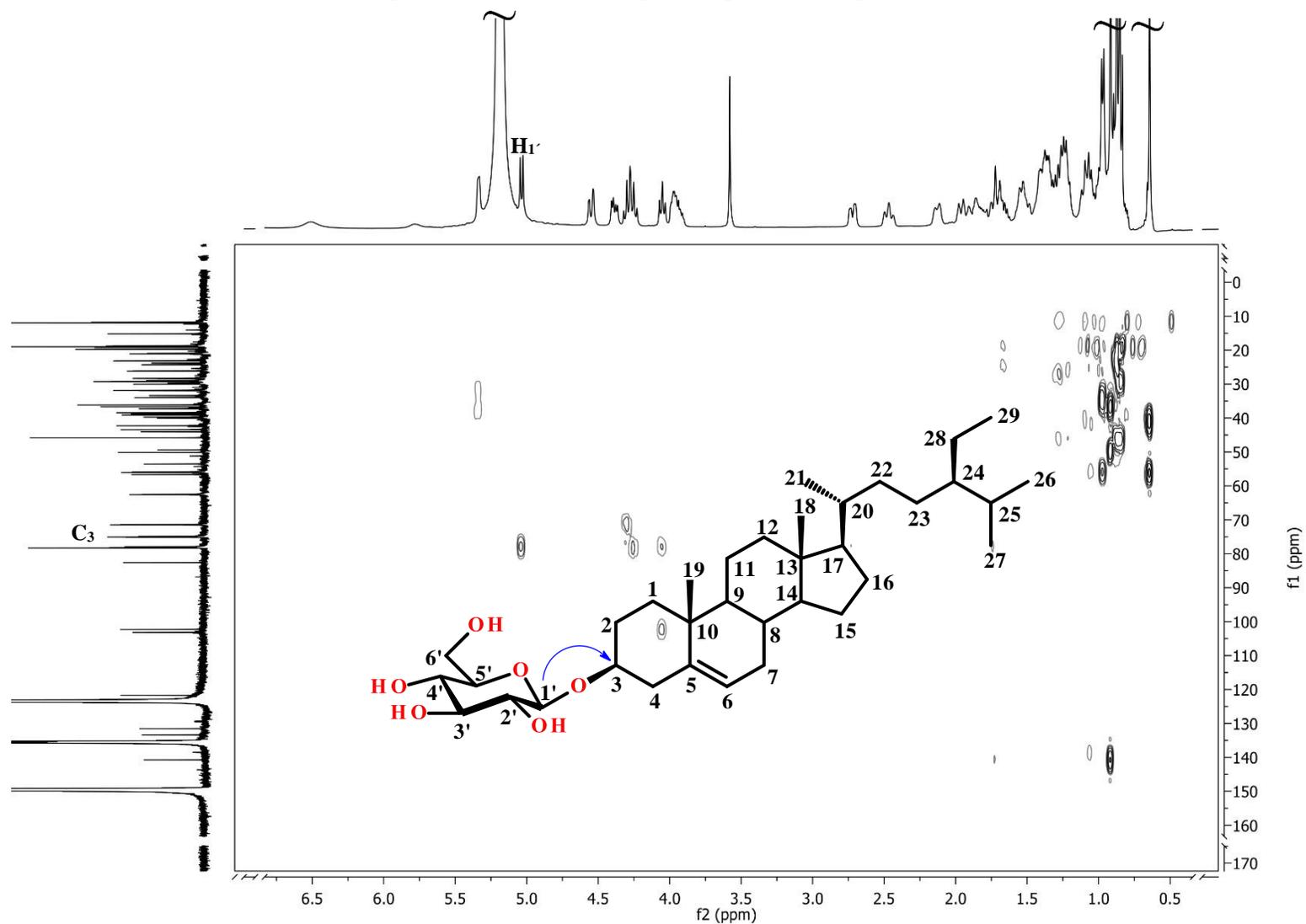
Apéndice 1-b. Espectro HSQC en D₂O del ácido 3, 4-dihidroxibenzoico (IVb).

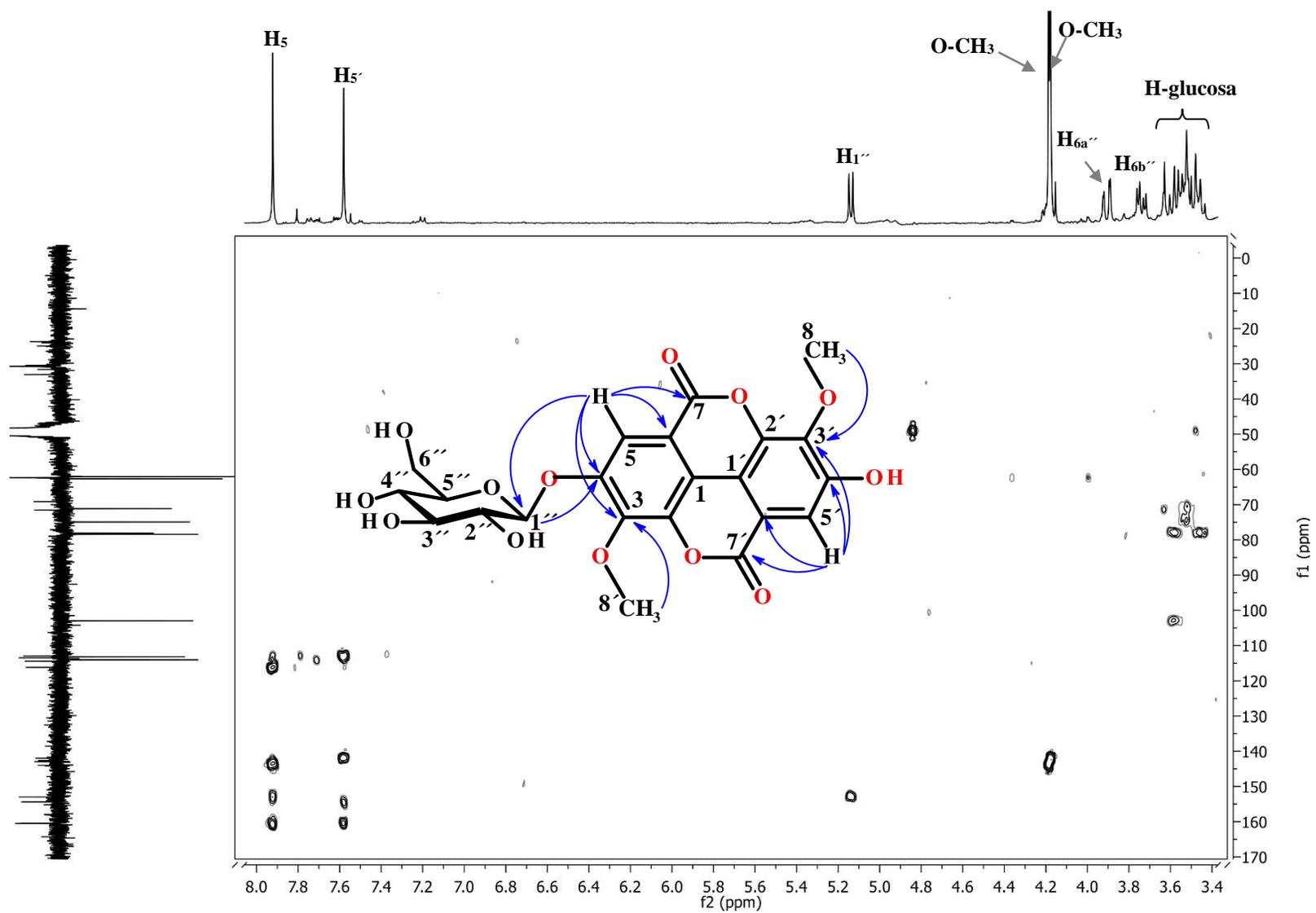


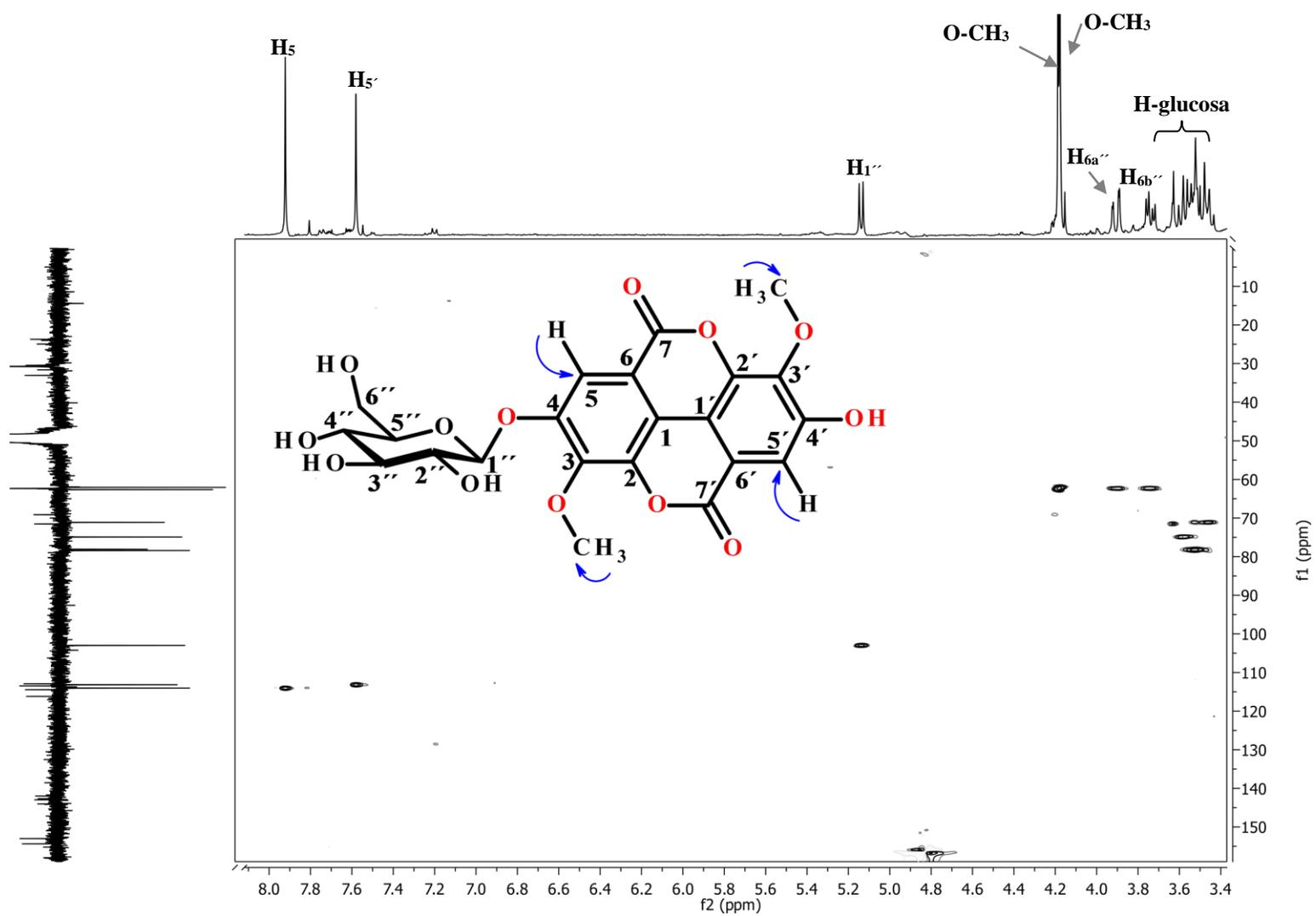
Apéndice 1-c. Espectro DEPTQ en piridina-*d*₅ de 3-*O*- β -D-glucopiranosido del β -sitosterol (V).



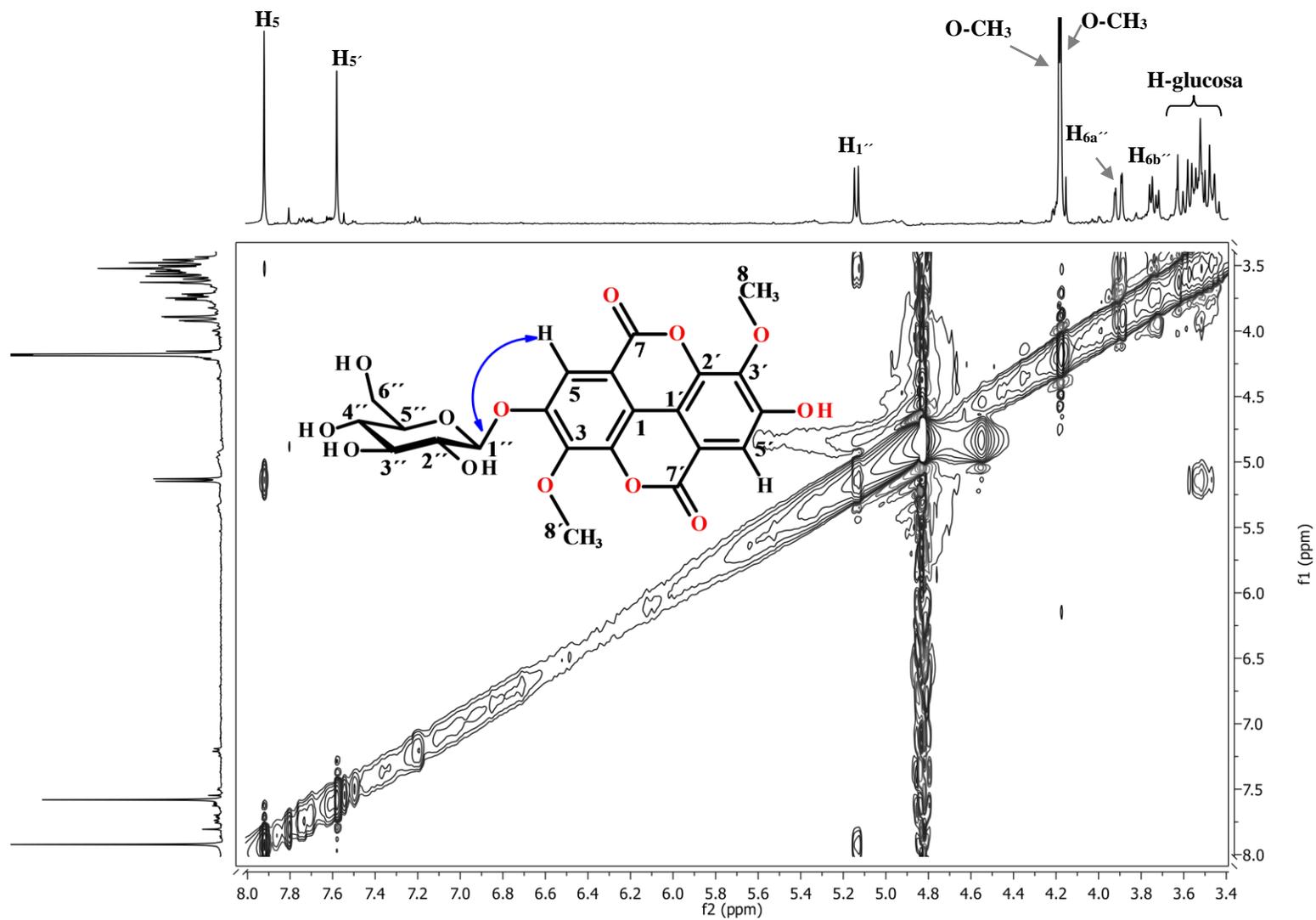
Apéndice 1-d. Espectro HMBC en piridina-*d*₅ de 3-*O*-β-D-glucopiranosido del β-sitosterol (**V**). El símbolo virgulilla hace referencia a que hubo un corte en la parte superior del espectro.

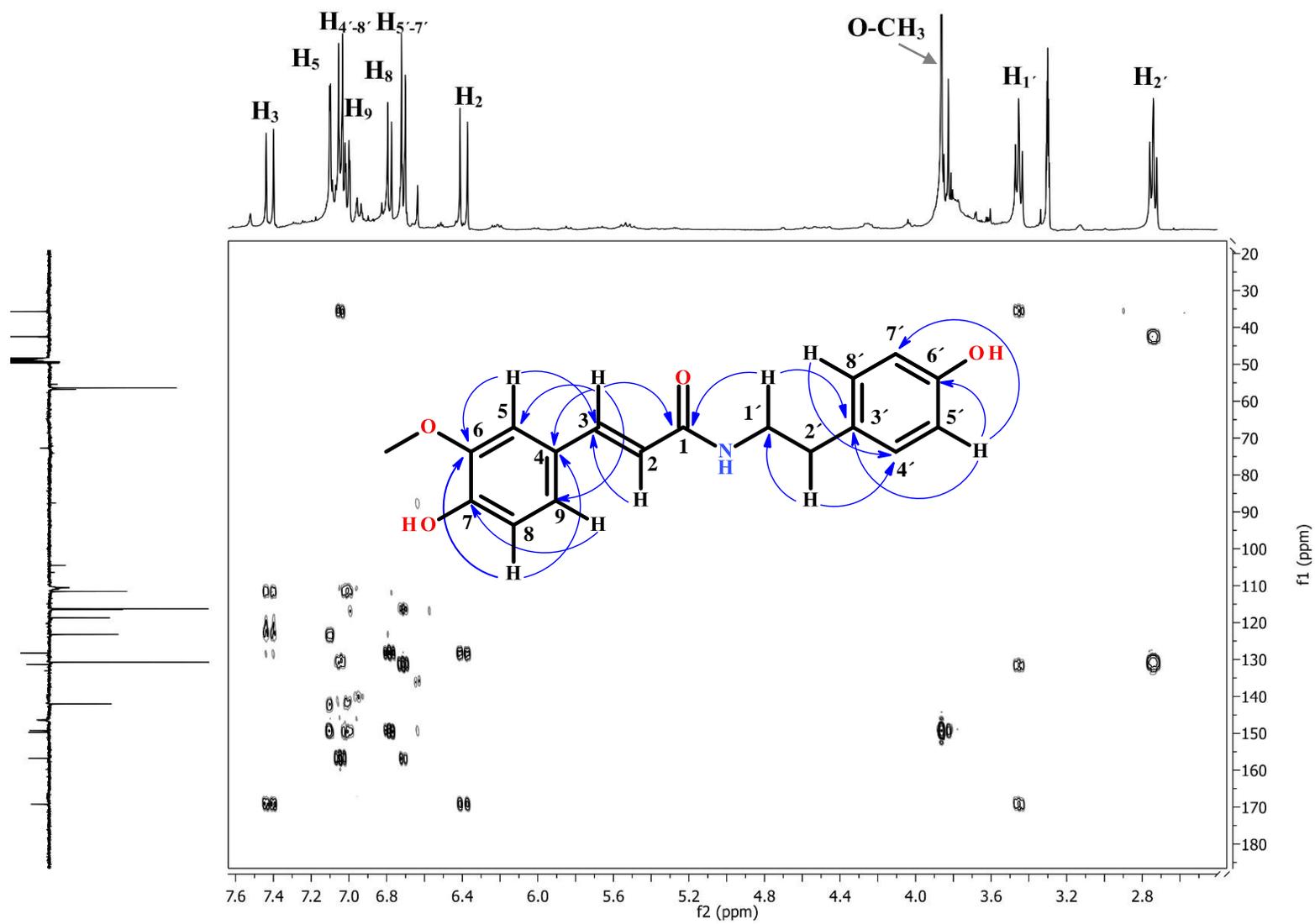


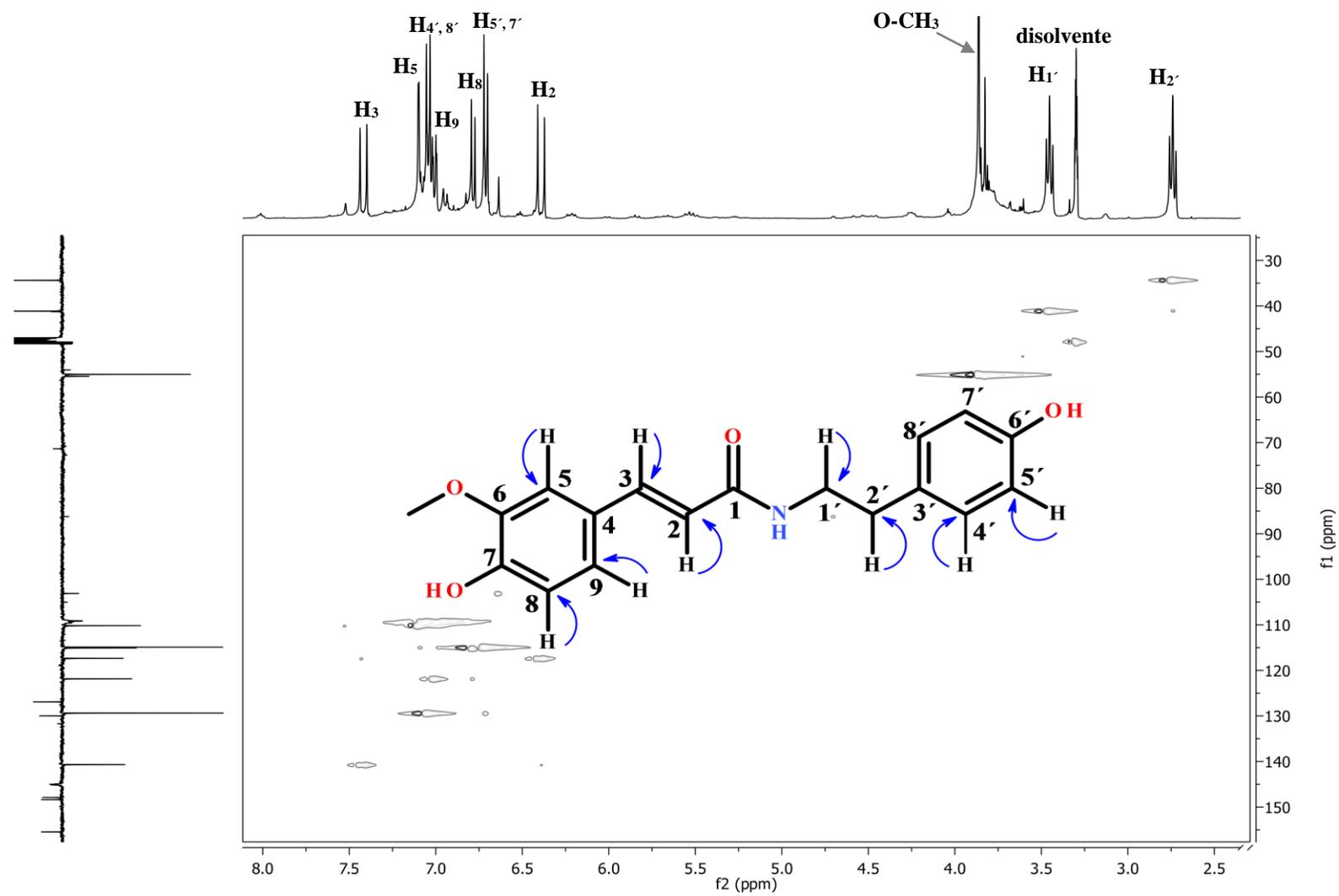
Apéndice 1-e. Espectro HMBC en CD₃OD de 4-*O*-β-D-glucopiranosido del ácido 3,3'-dimetil-elágico (IX).

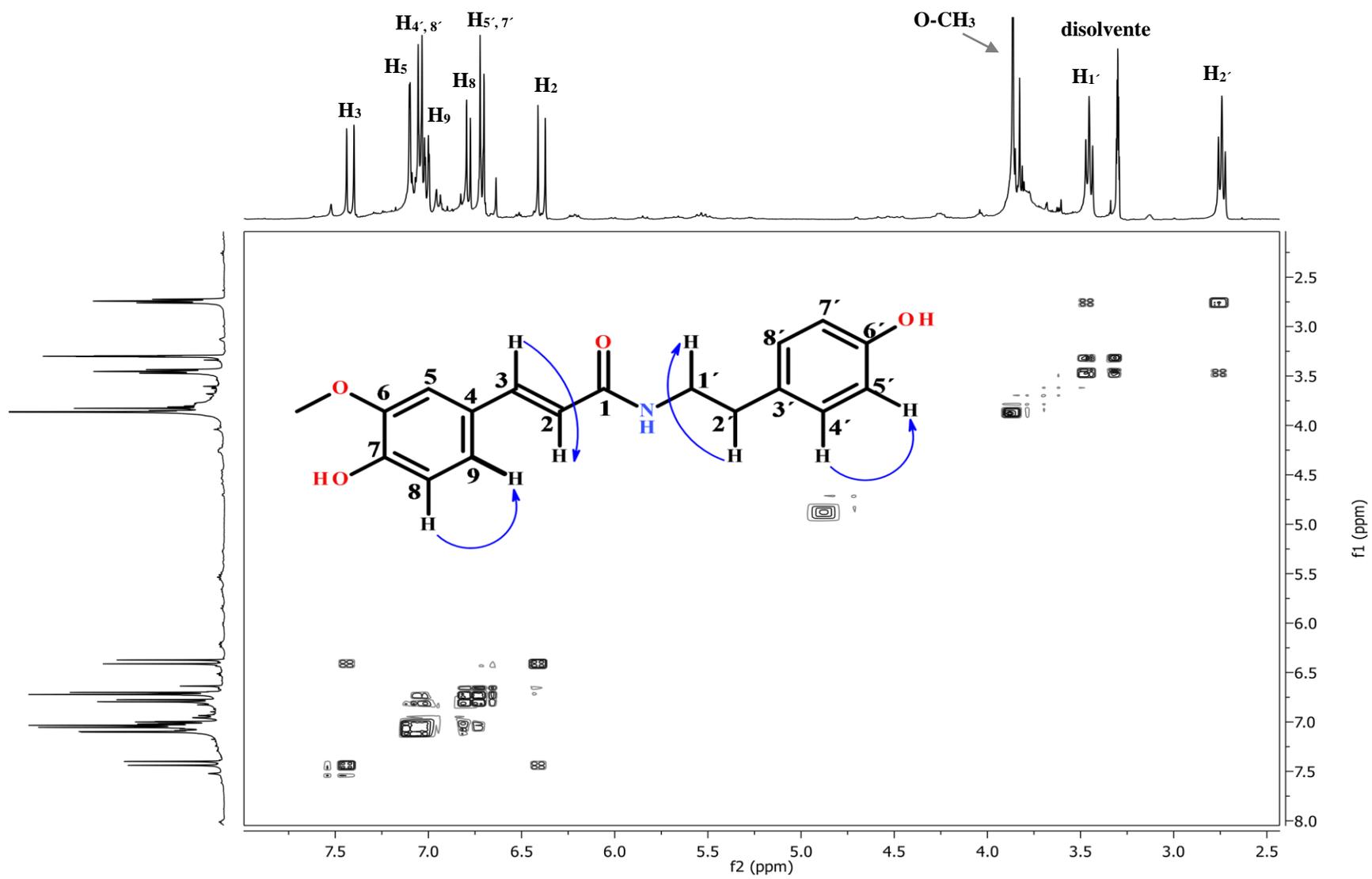
Apéndice 1-f. Espectro HSQC en CD₃OD de 4-*O*-β-D-glucopiranosido del ácido 3,3'-dimetil-eláxico (IX).

Apéndice 1-g. Espectro NOESY en CD₃OD de 4-*O*-β-D-glucopiranosido del ácido 3,3'-dimetil-elágico (IX).



Apéndice 1-h. Espectro HMBC en CD₃OD de (*E*)-*N*-feruloil tiramina (X).

Apéndice 1-i. Espectro HSQC en CD₃OD de (*E*)-*N*-feruloil tiramina (X).

Apéndice 1-j. Espectro COSY en CD₃OD de (*E*)-*N*-feruloil tiramina (**X**).

Apéndice 1-k. imágenes de algunos compuestos y mezclas obtenidos de los órganos de *A. cuspidata*.

Compuesto I



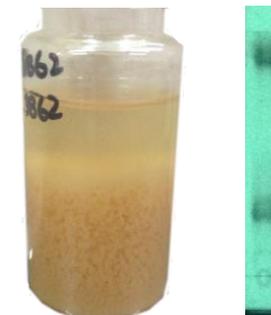
Polvo amarillo, soluble en DMSO, cristalizó con MeOH/acetona.

IIa y IIb



Aceitoso de color amarillo, soluble en cloroformo.

IVa



Precipitó con MeOH, color pardo.

Compuesto V



Sólido amorfo, blanco, soluble en piridina.

Compuesto VII y VIII



Cristales blancos, solubles en cloroformo.

Compuesto IX



Cristales blancos, solubles en MeOH.

Compuesto X



Sólido, color ámbar, soluble en MeOH.

Esta imagen corresponde al probatorio de no plagio, e indica que este trabajo tiene entre 0 y 9 % de similitud, puesto que es resultado propio, y cito las fuentes de donde se obtuvo información, para la redacción, uso de figuras y cuadros de esta investigación. Esta revisión de no plagio, se realizó en el siguiente link: <https://my.plag.es/> el 01 de septiembre de 2021.

